



MECANISMOS RESPONSABLES DE LA REMODELACIÓN NEURONAL CIRCADIANA EN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Tesis para optar por el título de
Doctora en Ciencia y Tecnología de la
Universidad Nacional de Quilmes



Licenciada Anastasia Herrero
Directora de tesis: Dra. María Fernanda Ceriani

Laboratorio de Genética del Comportamiento
Fundación Instituto Leloir
Marzo 2018

Resumen

Las neuronas laterales ventrales (LNvs) son esenciales para el correcto funcionamiento del reloj circadiano de *Drosophila melanogaster*. Años atrás, nuestro laboratorio reportó que estas neuronas reloj experimentan una remodelación diaria de sus proyecciones axonales, un fenómeno denominado plasticidad estructural circadiana. Se ha propuesto que estos cambios podrían proporcionar pistas adicionales para transmitir información de la hora del día, por ejemplo, resultando en la liberación diferencial de neurotransmisores. Las arborizaciones axonales presentan una mayor complejidad durante el día y menor durante la noche, lo que implica cambios en el grado de conectividad

A lo largo de esta tesis se evaluaron diferentes mecanismos moleculares que subyacen al fenómeno de plasticidad estructural y, en particular, el rol del neuropéptido PDF. En una primera etapa, alterando de forma diferencial el reloj molecular de las LNvs, demostramos que la remodelación diaria de las terminales depende del correcto funcionamiento de su propio reloj, pero que en este fenómeno también participa el reloj de la glia. En paralelo se evaluó el rol del neuropéptido PDF y su contribución a la plasticidad estructural en distintos momentos del día. Haciendo uso de distintas herramientas que permiten acotar la desregulación, demostramos que la alteración de sus niveles afecta directamente a este fenómeno, y que tanto el PDF liberado por las sLNvs como por las lLNvs contribuyen al proceso. Llamativamente, encontramos que si bien la disminución aguda de PDF resulta en una mayor complejidad de las terminales que se mantiene invariable a lo largo del día, la reducción sostenida se asocia a menor complejidad. Esta respuesta dual es interesante en sí misma. Finalmente, aportamos evidencia que sugiere que la acción de PDF sobre la plasticidad estructural recluta mecanismos dependientes de actividad, los cuales operan diferencialmente a lo largo del día.

Agradecimientos

Cinco años que hoy parece pasaron volando, pero sí que se hicieron lentos varias veces (¡unas cuantas!).

En primer lugar, gracias Fer. Gracias por tantas cosas, por estar presente en cada uno de los detalles durante estos años, experimentales y personales. Gracias por la motivación de todos los días, por enseñarme que las mujeres somos fuertes y podemos ser exitosas científicas, sos un ejemplo. Gracias por encaminarme en esos momentos en los que el camino se hacía difuso y por enseñarme tantos aspectos de esta profesión tan linda (y sacrificada).

Agradecida de haber trabajado con un grupo de gente “muy lo más”, los chicos del 109. Gracias por hacer más ameno el día a día, por las discusiones científicas, filosóficas y bizarras. Gracias a aquellos que estuvieron en el 109 y tuve el privilegio de haber conocido y aprendido de ellos, y a los actuales miembros, Lia, Jose, Juan, Magui y Sofi, realmente son un grupo excepcional de personas. Gracias por el café de todos los días, por la ayuda desinteresada, y por sobre todas las cosas, enseñarme a ser una mejor persona. Quiero agradecer especialmente a Nico y Nara, que formaron parte de nuestro laboratorio hace un tiempo y me ayudaron mucho siendo parte de “los más grandes” del grupo.

También quiero agradecer a la gente con la que compartimos el día a día en el instituto, en especial a los “chicos del flyroom”, con quienes compartimos el trabajo de todos los días, donde no faltan charlas, risas y consejos experimentales. No puedo dejar de lado a aquellos que a pesar de no formar parte del flyroom, formaron parte de cada uno de mis días, como los chicos del 104, Pame, Silcho, Lautu y Nanu, o Elvi y Aguito del 107. Gracias infinitas a Sole (ex 103), por toda la ayuda experimental y su buena onda.

Muchas gracias a los integrantes de mi CST, Guille Lanuza, Fer Ledda y Ale Rabossi, por todos los consejos año a año.

Gracias a mi familia, son todo lo que está bien en esta vida. Sin ellos no hubiera llegado a ningún lado. No hay palabras para agradecerles por TODO lo

que hacen por mí. A mis viejos y mi “hermanita”, son el regalo más lindo de todos.

A mis amigos, los de siempre y los de ahora. Gracias a especiales a las chicas de Comodoro, 17 años aguantándome no es poco, no voy a cansarme de explicarles que no juego con moscas. Gracias a Andre y Noe, por transitar el camino del joven científico a mi lado, después de haber transitado una carrera universitaria juntas.

Gracias a mi familia de Villa Crespo, por adoptarme como un miembro más de Acevedo. Gracias por la contención de todos los días, por cuidarme y preocuparse por mí. Gracias Lili, Eze y Aye.

Y por último, gracias al “chino”. Gracias por ser mi compañero, escucharme decir charlas, o contar experimentos sin siquiera entender de que hablaba; por contenerme cuando colapsaba o “el control no anduvo”. Gracias por todo, por cambiar mis últimos años de doctorado y hacerme una persona muy feliz. Gracias por tantas aventuras y todas las que vendrán.

Índice

Tabla de contenido

Introducción.....	12
Propiedades de los relojes circadianos	12
<i>Drosophila melanogaster</i> y los ritmos circadianos.....	13
El reloj molecular de <i>Drosophila</i>	16
El estudio de los <i>outputs</i> del reloj	18
La red neuronal circadiana de <i>Drosophila</i>	20
Las neuronas laterales ventrales, el circuito PDF.....	23
Plasticidad estructural circadiana	26
La vía de señalización del neuropéptido PDF	29
La glia en el sistema nervioso de <i>Drosophila</i>	31
Glia y comportamiento circadiano	32
La glia y el circuito PDF	33
 Objetivos e hipótesis.....	 37
 Materiales y métodos.....	 39
1. Líneas de <i>Drosophila</i> empleadas	39
1.1. Mantenimiento de Stocks	39
1.2. Nomenclatura de <i>Drosophila</i>	39
1.3. Cromosomas balanceadores y generación de líneas	40
1.4. El sistema GAL4/UAS y el sistema GeneSwitch	41
1.5. Inducción de los sistemas de expresión en larvas, pupas y adultos	44
1.6. Stocks utilizados	44
2. Análisis de la actividad locomotora.....	45
2.1. Análisis automatizado de la actividad locomotora	45

3.	Técnicas de biología molecular	47
3.1.	Análisis de presencia de elementos transponibles en líneas recombinantes	47
3.1.1.	Extracción de ADN genómico de una cabeza	47
3.2.	Análisis de los niveles de expresión génica por qRT-PCR	48
3.2.1.	Extracción de ARN de cabeza de moscas	48
3.2.2.	Reacción de retrotranscripción.....	48
3.2.3.	PCR en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR)	49
4.	Inmunohistoquímica y análisis de imágenes	50
4.1.	Inmunohistoquímicas en cerebros de moscas adultas.....	50
4.1.1.	Anticuerpos utilizados	50
4.1.2.	Anticuerpos primarios.....	50
4.1.3.	Anticuerpos secundarios	51
4.2.	Microscopía y procesamiento de imágenes	51
4.3.	Análisis de niveles de PDF en la proyección dorsal y en los somas	52
4.4.	Análisis de complejidad del circuito PDF: cruces totales y largo de las terminales.....	52
5.	Análisis estadístico	53

Resultados.....57

Capítulo I: Los relojes que regulan el fenómeno de plasticidad estructural	57
--	----

1. El reloj de las sLNvs es necesario para la remodelación estructural circadiana.....	57
--	----

1.1. Herramientas para desregular el reloj molecular de Drosophila	57
--	----

1.2. Alterar los niveles de diferentes componentes del reloj altera las oscilaciones moleculares	62
1.3. La plasticidad estructural circadiana se ve alterada de forma diferencial por los diferentes componentes del reloj molecular.....	65
2. El reloj de la glia contribuye a la regulación de la plasticidad estructural circadiana de las terminales dorsales de las sLNvs	68
1. Conectividad entre los dos <i>clusters</i> PDF ⁺	72
2. Modulación aguda de los niveles de PDF en las LNvs	76
2.1. Niveles transcripcionales de pdf.....	77
2.2. Efectos sutiles en la inmunoreactividad de PDF	79
2.3. Pérdida de la remodelación estructural.....	80
3. La actividad eléctrica neuronal y su relevancia sobre <i>outputs</i> del reloj	81
3.1. Depolarizar las LNvs afecta los niveles de PDF en forma diferencial a lo largo del día	83
3.2. Efectos de la depolarización sobre la plasticidad estructural .	84
3.3. La depolarización aguda de las LNvs es suficiente para rescatar los niveles de PDF	85

Discusión y conclusiones.....91

Mecanismos autónomos de célula subyacen a la remodelación continua de las terminales neuronales.....	92
--	----

Efectos diferenciales derivados de la disrupción aguda y crónica del reloj	94
--	----

La contribución de los relojes de la glia a la plasticidad estructural de las sLNvs	94
---	----

La acción conjunta de las ILNvs y sLNvs modula la plasticidad estructural.....	96
--	----

Alterar de forma aguda y sutil los niveles de PDF es suficiente para interferir con el fenómeno de plasticidad estructural	98
--	----

El neuropéptido PDF modula la plasticidad estructural alterando la actividad en forma local.....	99
Conclusiones	102
Anexos.....	106
Anexo 1	106
Anexo 2	107
Anexo 3	107
Bibliografía.....	110

Introducción

Ritmos circadianos

Los movimientos de la tierra imponen cambios ambientales cíclicos sobre los seres vivos. Por un lado, la rotación sobre su propio eje determina cambios en la disponibilidad de luz solar, mientras que la translación alrededor del sol implica cambios anuales de fotoperíodo y temperatura. Es así que todos los organismos presentan ritmos biológicos (cambios de variables biológicas) que son capaces de ajustarse a estos movimientos del planeta. Aún más, es clara la ventaja adaptativa que otorga la presencia de dichos relojes biológicos capaces de anticipar los mencionados cambios ambientales (Beaver et al., 2002; DeCoursey et al., 2000; Michael et al., 2003).

La presencia de ritmos de 24 horas en los seres vivos es evidente. Cuando estos ritmos biológicos endógenos tienen un período cercano a las 24 horas son llamados ritmos circadianos (del latín, *circa*=cerca y *diem*=día), y como se desprende de lo mencionado, permiten a los organismos predecir los cambios diarios en el ambiente que los rodea y adaptar sus comportamientos y fisiología en forma acorde. Sin embargo, no todos los ritmos presentes en la naturaleza son circadianos, también existen numerosos ejemplos de ritmos anuales o estacionales (de períodos mayores a 24h) llamados infradianos, así como otros con períodos más cortos llamados ultradianos, como por ejemplo ciertas secreciones hormonales. De todos ellos, los ritmos circadianos son los más conservados entre los distintos organismos y el reloj biológico que lo gobierna es, por lo tanto, el más estudiado. La ventaja adaptativa que representa el poseer un reloj funcional ha sido demostrada experimentalmente en cianobacterias (Ouyang et al., 1998) y en *Drosophila* (Beaver et al., 2002).

Propiedades de los relojes circadianos

Los relojes circadianos están definidos en base a cuatro propiedades canónicas. En primer lugar, sus oscilaciones **persisten en condiciones ambientales constantes**, o "condiciones de libre curso", que indican la presencia de un reloj autónomo. Si bien los ritmos circadianos **son sincronizados diariamente** por claves ambientales o *zeitgebers* (del alemán,

dador del tiempo, siendo probablemente la luz el *zeitgeber* más importante para la mayoría de las especies terrestres), sorprendentemente se evidencian con un período cercano a las 24 horas aún en ausencia de ellos. Y es gracias a este reloj circadiano endógeno que tienen la posibilidad de **anticipar** y preparar su fisiología a los cambios ambientales. Por último, los relojes se caracterizan por poseer **mecanismos de compensación a cambios de temperatura**, los cuales posibilitan que el período de las oscilaciones no se modifique al variar la misma dentro de un rango fisiológico, el cual es diferente para cada especie.

Todas estas propiedades permiten la interacción del reloj endógeno con los ciclos externos, modificando el período del mismo y equiparándolo al del ciclo ambiental.

***Drosophila melanogaster* y los ritmos circadianos**

Dadas las propiedades anteriormente descritas, el reloj circadiano se conceptualiza como un sistema de tres componentes: las llamadas vías de entrada (*inputs*, componente exógeno, *zeitgeber*) a través de las cuales llega la información del ambiente; un oscilador central (componente endógeno) formado por células marcapasos que mantienen el ritmo y determinan el período endógeno, y las vías de salida (*outputs*, ritmos biológicos) que reciben la información del oscilador y modulan circadianamente diversas funciones biológicas (Figura 1).

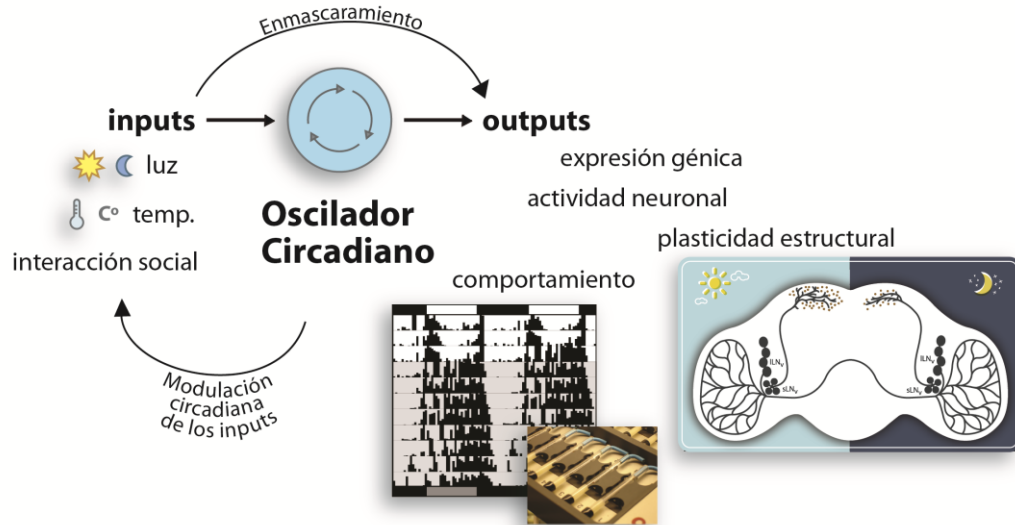


Figura 1: Mecanismos generales de los ritmos biológicos. Modificado de (Muraro and Ceriani, 2014).

En *Drosophila*, la principal clave sincronizadora es la luz, aunque también los ciclos de alta y baja temperatura (Glaser and Stanewsky, 2007) y la actividad social (Levine et al., 2002) funcionan como *zeitgebers*. Por lo tanto, las vías de entrada del sistema circadiano consisten principalmente en estructuras fotorreceptivas como los fotorreceptores de los ojos compuestos, los ocelos y dos estructuras extrarretinales llamadas los ojuelos de Hofbauer-Buchner (H-B eyelets). A su vez, la luz es percibida directamente en las células que contienen un oscilador a través del fotorpigmento criptocromo (CRY por su nombre en inglés *cryptochrome*) (Emery et al., 1998; Stanewsky et al., 1998).

El oscilador central reside en un grupo de neuronas del sistema nervioso central que funciona como marcapasos, comandando el ritmo endógeno del individuo y sincronizando la actividad de osciladores periféricos subordinados en distintos tejidos (Reppert and Weaver, 2001). En los mamíferos los ritmos circadianos están controlados por un grupo de neuronas que conforman los núcleos supraquiasmáticos hipotalámicos (NSQ o SCN en inglés), dos grupos de células nerviosas que están localizadas en la base del tercer ventrículo, sobre el quiasma óptico, en la parte anterior del hipotálamo. La lesión de los mismos trae aparejada la pérdida de la mayoría de estos ritmos, mientras que el trasplante de tejido embrionario que contenga estos núcleos los restaura (Meijer and Rietveld, 1989), introduciendo la ritmicidad del donante en el receptor (Ralph and Lehman, 1991). En ratones, cada NSQ contiene

aproximadamente 10.000 neuronas divididas en dos regiones: una región ventral (también denominada “core”), y una región dorsal (también denominada “Shell”). En *Drosophila* el reloj constituye una red circadiana de aproximadamente 150 neuronas. En estas neuronas las oscilaciones moleculares de los ARN mensajeros y proteínas codificadas por ciertos genes del reloj son las responsables de generar y mantener el periodo endógeno.

Las vías de salida desde el oscilador central constituyen el elemento circadiano del que menos información se posee. Estas vías incluyen procesos biológicos de distinto grado de complejidad que van desde el control de expresión de genes de segundo orden por parte de componentes canónicos del reloj, hasta la modulación de señales eléctricas, endócrinas y metabólicas que impactan en la fisiología de los tejidos periféricos. Por medio de estas vías de salida, el reloj circadiano modula procesos como ciclos de actividad y reposo, temperatura corporal, síntesis y liberación de hormonas, habilidad cognitiva, entre otros. En *Drosophila*, el comportamiento circadiano más estudiado es la actividad locomotora (Figura 2).

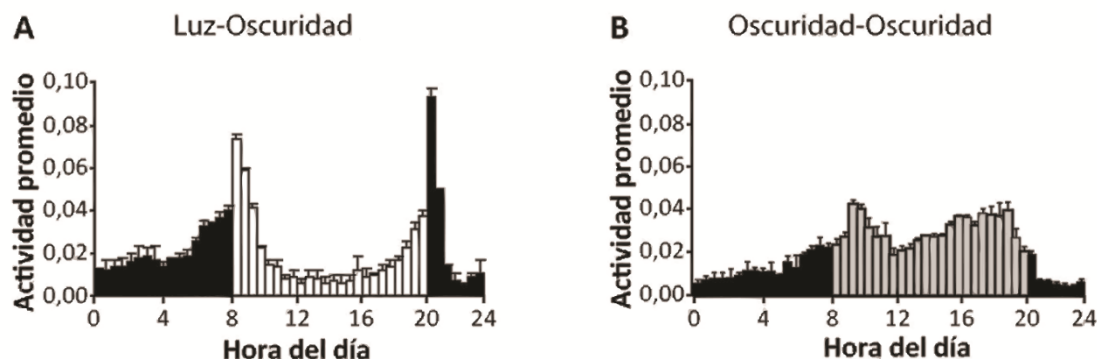


Figura 2: Patrón poblacional de actividad locomotora de moscas macho *wild type* (salvajes). **A.** En presencia de ciclos de luz-oscuridad (LD, *light-dark*). Las moscas son animales crepusculares con dos picos de actividad, uno al amanecer y otro al atardecer, separados por una fase de baja actividad o *siesta*. Las barras negras y blancas representan períodos de oscuridad y luz respectivamente. **B.** En ausencia de claves ambientales (DD, *dark-dark*). El patrón comportamental es básicamente constante a lo largo del día subjetivo con pequeños incrementos de actividad en torno al inicio del día y de la noche subjetiva. Las barras negras y grises representan períodos de noche y día subjetivos respectivamente. Día subjetivo: momento del día donde debería haber luz si es que hubiera claves ambientales. Modificado de (Dubowy and Sehgal, 2017).

Tal como se mencionó en párrafos previos para poner evidencia la acción del reloj endógeno es necesario aislar al individuo de todas las claves ambientales, y dejarlo en condiciones de libre curso (en inglés, *free running*). Cuando esto se lleva a cabo con *Drosophila*, el comportamiento observado

copia el anteriormente descrito, con pequeñas variaciones. En estos casos, se evidencia un pequeño aumento de la actividad en torno al momento en el cual el día debería comenzar (inicio del día subjetivo), luego un período de actividad más o menos constante, para volver más tarde a un nuevo aumento de la actividad, pero esta vez más pronunciado, al comienzo de la noche subjetiva.

Por otra parte, existen mecanismos de *enmascaramiento* por medio de los cuales las vías de entrada pueden modular directamente la fisiología (Figura 1). Por ejemplo, la luz afecta de forma directa la actividad locomotora por lo cual incluso aquellos organismos que no poseen un reloj funcional pueden responder a las transiciones de fase mostrando un comportamiento que varía a lo largo del día pero no está controlado por un ritmo endógeno (Ashmore and Sehgal, 2003; Wheeler et al., 1993).

El reloj molecular de *Drosophila*

Se ha logrado identificar la existencia de dos ciclos transcripcionales de retroalimentación negativa, que conforman el reloj molecular de *Drosophila*, los cuales son fundamentales para la generación y el mantenimiento del mismo (Allada et al., 1998; Cyran et al., 2003; Glossop et al., 2003; Glossop et al., 1999; Rutila et al., 1998).

En el primero de los ciclos, los factores de transcripción CLOCK (CLK) y CYCLE (CYC) heterodimerizan y se unen a las secuencias *E-box* presentes en los promotores de genes como *period* (*per*), *timeless* (*tim*), *vri* (*vri*) y *pdp1* (*par domain protein 1*), y de otros tantos genes regulados directamente por el reloj. La unión del heterodímero a las secuencias promotoras activa la transcripción generando un pico máximo de ARN mensajero de *per* y *tim* al inicio de la noche (entre 2-4 horas después de apagada la luz o ZT14-16. ZT – *Zeitgeber Time*- se refiere a las horas transcurridas desde la última transición luz-oscuridad) (Figura 3). Sin embargo, las proteínas no se acumulan debido a la fosforilación de PER vía DBT que lleva a la ubiquitinación y degradación mediada por la E3 ligasa SLIMB. A su vez, durante el día la unión de CRY a TIM promueven cambios conformacionales que disparan su degradación

vía proteasoma. Hacia la mitad de la noche se alcanzan niveles de PER y TIM tales que permiten su dimerización y el complejo PER-TIM-DBT es translocado al núcleo en un proceso dependiente de la fosforilación por SGG. Una vez en el núcleo, el complejo PER-TIM o sólo PER se uniría a CLK reprimiendo su propia transcripción. Este ciclo finaliza al comenzar el día cuando la presencia de la luz dispara la degradación de TIM mediada por CRY.

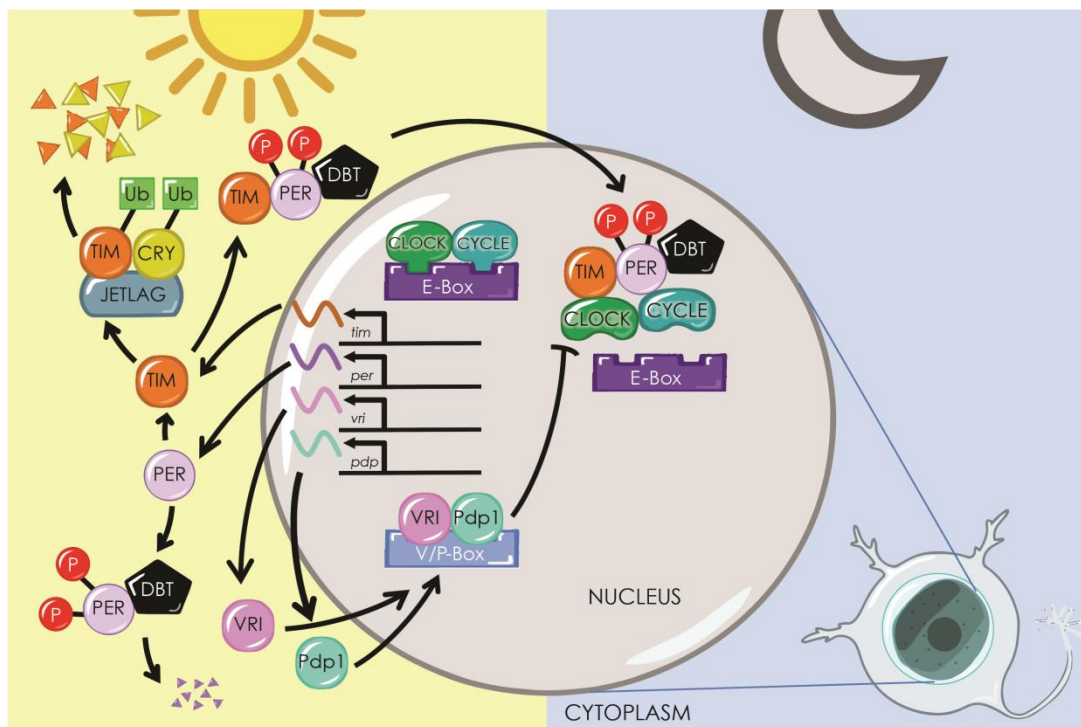


Figura 3: Los dos ciclos de retroalimentación negativa. Gráficos modificados de UC San Diego BioClock Studio (CC BY 4.0).

El segundo ciclo está determinado por las oscilaciones de VRI y PDP1ε. Durante el día y el inicio de la noche CLK y CYC activan la transcripción de *vri* y *pdp1*. VRI se acumula en fase con su mensajero e inhibe la transcripción de *clk* (Figura 3). Por su parte, PDP1 se acumula más lentamente y al final de la noche activa la transcripción de *clk*. De esta forma, los niveles de CLK oscilan en antifase con los mensajeros de los genes bajo su control de transcripción. Finalmente, una vez que se libera la represión por parte de PER, el dímero CLK/CYC es capaz de dirigir la transcripción de *per*, *tim*, *vri* y *pdp1* para que comience un nuevo ciclo. La relevancia de VRI y PDP1 en la regulación positiva sobre los niveles de *clk* es clara en las neuronas del marcapasos central pero factores adicionales parecerían ser relevantes para el segundo ciclo en otras neuronas de la red circadiana.

Distintos *zeitgebers* pueden sincronizar al oscilador (Figura 1). Como ya se ha dicho, el más importante es la luz, pero el reloj circadiano puede ser sincronizado también por temperatura (Glaser and Stanewsky, 2007), claves sociales (Levine et al., 2002) y el magnetismo terrestre (Yoshii et al., 2009a), entre otros.

En condiciones normales, cuando los *zeitgebers* sincronizan al reloj molecular, se utiliza la denominación “*zeitgeber time*” (ZT) para referirse al tiempo pasado desde la última transición. Así, por ejemplo, en el caso de la luz, se utiliza ZT para referirse al tiempo transcurrido desde la última transición oscuridad-luz, y usualmente es indicado en horas tiempo. Por ejemplo, ZT2 indica que pasaron 2 hs desde que la luz se prendió. De manera similar, en condiciones de libre curso se utiliza la denominación “*circadian time*” (CT) para referirse al tiempo transcurrido desde el momento en que debería haber ocurrido la transición. En el caso de la luz, CT2 indicaría que transcurrieron 2 hs desde que la luz debería haberse encendido, en caso que el periodo endógeno sea similar a 24h.

El estudio de los *outputs* del reloj

Una de las funciones principales del reloj circadiano es lograr que cada proceso del organismo se lleve a cabo en una fase determinada del ciclo ambiental diario, favoreciendo así su adaptación con el medio ambiente.

La actividad locomotora de ritmos circadianos se representa frecuentemente en gráficos denominados “actogramas” (Figura 4), donde las barras horizontales superiores representan los ciclos de luz/oscuridad de cada día. Las barras negras horizontales graficadas de lado

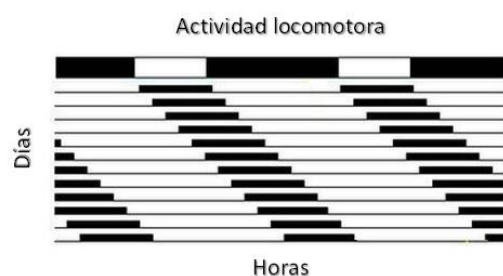


Figura 4: Actograma *doublé-plot* esquemático de un animal sometido a foto periodos cortos (LD 6:6). Modificado de (Jud et al., 2005; Sharma, 2002).

a lado (durante los períodos de luz) representan la actividad, mientras que el alto de cada una de ellas indica el número de eventos para el intervalo dado

(por ejemplo, 5 minutos). Alineando el mismo actograma dos veces, dos días consecutivos son graficados de forma contigua para así obtener la llamada doble gráfica, o “*double plot*”, lo que facilita la visualización de ritmos existentes.

En entornos de luz/oscuridad (LD), el animal está sincronizado y su actividad comienza siempre a la misma hora y, por lo tanto, su período es de 24 horas (Figura 5). En condiciones constantes, sin embargo, el período endógeno de los

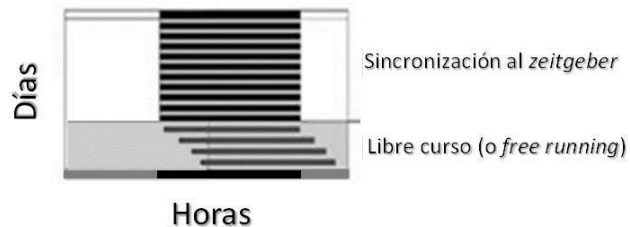


Figura 5: Esquema del registro de actividad locomotora de un animal nocturno en condiciones de laboratorio. Inicialmente sincronizado a un ciclo de luz/oscuridad de 24 hs, y bajo condiciones de oscuridad constante, el ritmo entra en libre curso con su período endógeno. Modificado de (Jud et al., 2005; Sharma, 2003).

animales puede variar. En ausencia de un ciclo de luz/oscuridad que actúe como sincronizador, los animales comienzan a estar activos cada día un poco más tarde, o un poco más temprano, dependiendo de la especie en estudio, manteniendo la fase de actividad según la hora que le indica su reloj biológico endógeno.

Por más sorprendente e intrigante que sea la existencia de ritmos en libre curso, no debe olvidarse que la gran mayoría de las especies vive en ambientes cíclicos y la existencia de un reloj biológico solo tendría sentido adaptativo si el ritmo endógeno pudiese ajustarse a los ciclos ambientales. Este ajuste ocurre gracias a la sensibilidad de la mayoría de los organismos a las alternancias del medio ambiente y cada especie percibe y responde a las fases del ciclo ambiental más importante para su supervivencia. En presencia del *zeitgeber* el reloj biológico tiene su período y fase ajustados finamente al ciclo ambiental, en un proceso conocido como sincronización (Pittendrigh, 1960). Sea cual fuere el período en libre curso, la sincronización garantiza la vinculación del reloj biológico con los ciclos ambientales. En el caso del reloj circadiano, el mejor conocido y más estudiado, el ciclo de luz/oscuridad ajusta ritmos de especies cuyo período en libre curso (representado por la letra griega tau, τ) es menor que 24 horas tan eficientemente como de aquellas con τ mayor que 24 horas (Aschoff et al., 1975).

La red neuronal circadiana de *Drosophila*

Actualmente se conocen unas 150 neuronas en el cerebro adulto de *Drosophila melanogaster* que expresan TIM y PER, lo que define que sean conocidas como “neuronas reloj”. La mayoría de las actualmente conocidas como tales, fueron identificadas utilizando anticuerpos contra algunas de las proteínas centrales del reloj circadiano (**Error! No se encuentra el origen de a referencia.**). Estas neuronas reciben sus nombres en función de su posición en el cerebro, tamaño y patrón de expresión génica. Así se pueden encontrar dos grandes grupos, las neuronas laterales y las neuronas dorsales (*LN* y *DN* respectivamente, por sus siglas en inglés) (Figura 6). Las *DN* se subdividen a su vez en tres subgrupos a cada lado del cerebro, *DN₁* (15 neuronas), *DN₂* (2 neuronas) y *DN₃* (40 neuronas). Por otro lado, las *LN* están formadas por cuatro pequeños subgrupos, también ubicados a cada lado del cerebro. Estos subgrupos están conformados por 3 a 4 neuronas posteriores laterales, 6 neuronas laterales dorsales, 5 neuronas laterales ventrales pequeñas y 4 neuronas laterales ventrales grandes (*LPN*, *LN_d*, *sLN_v* y *ILN_v* respectivamente, por sus siglas en inglés). De las 5 *sLN_v*, 4 expresan el neuropéptido Pigment Dispersing Factor (PDF), al igual que las *ILN_v*; la restante *sLN_v* es conocida como la quinta *sLN_v* (5- *sLN_v*) y no lo expresa. (Figura 6).

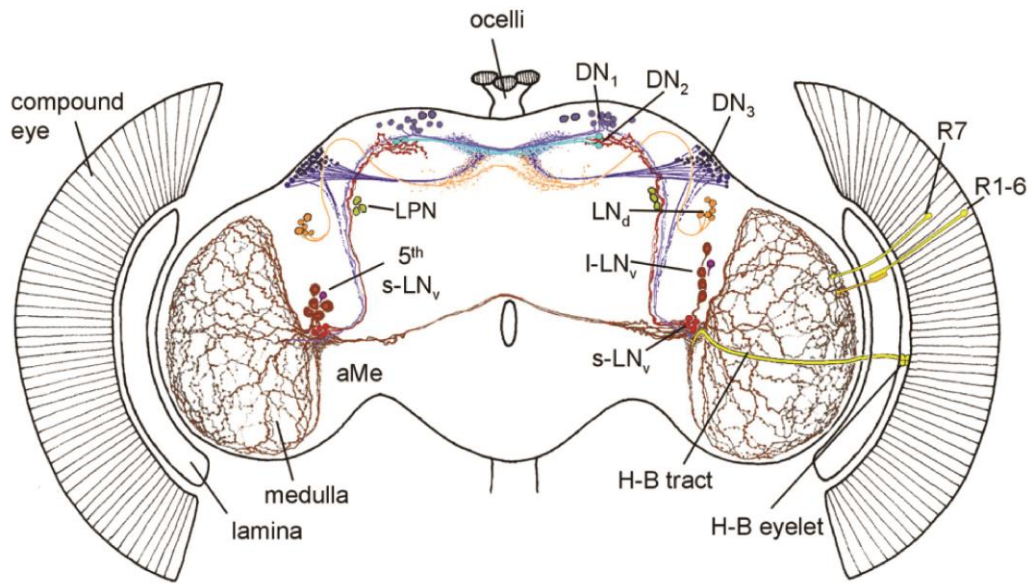


Figura 6: El circuito neuronal de la mosca adulta. Grupos neuronales que expresan los genes del reloj. Además de las neuronas del circuito circadiano, el esquema representa las principales estructuras fotoperceptivas que transmiten la información lumínica al reloj endógeno (los rabinos R7 y R1-6 del ojo compuesto, los ocelos, *H-B eyelet* y *H-B tract*). *aMe* es la médula accesorio, región donde se encuentran los somas de las *LN_v*. *Pl*: *Pars Intercerebralis*. Modificado de (Helfrich-Forster et al., 2007).

Es importante destacar que cada una de las neuronas dentro de los distintos grupos pueden no ser funcionalmente idénticas, ya que pueden recibir y liberar distintos neurotransmisores o neuropéptidos, expresar distintos complementos de genes o incluso diferenciarse de las proyecciones axonales y dendríticas (Figura 7).

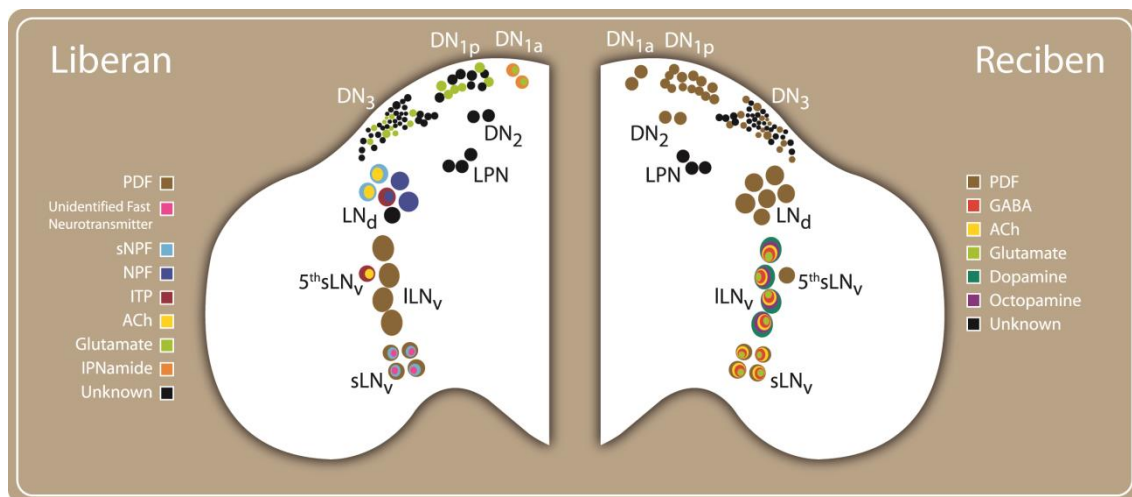


Figura 7: Caracterización neuroquímica de neuronas del circuito circadiano. El panel izquierdo detalla neurotransmisores/ neuropéptidos liberados por cada grupo de neuronas, mientras que el derecho cuales son los que reciben. El color distinto en las neuronas indica las moléculas que expresan dichas células. NPF (Neuropéptido F), sNPF (*short* NPF), ITP (*Ion Transport Peptide*) y Ach (Acetilcolina). Cuando no se conoce el contenido peptidérgico de las neuronas se indica con color negro. Modificado de (Muraro et al., 2013).

La actividad conjunta de las neuronas del circuito circadiano define un comportamiento locomotor rítmico robusto pero plástico a distintas condiciones ambientales. En ese sentido, las DN_2 y LPN están involucradas en el entrenamiento por temperatura (Miyasako et al., 2007; Yoshii et al., 2009b), un subgrupo de las DN_1 integra tanto información lumínica como térmica para controlar el comportamiento locomotor rítmico (Zhang et al., 2010), las LN_d y la 5ta sLN_v (PDF) controlarían la actividad locomotora durante el atardecer (Grima et al., 2004; Stoleru et al., 2004) o la actividad durante todo el día en fotoperiodos largos (Rieger et al., 2009) mientras que las sLN_v PDF+ controlarían la actividad locomotora durante el amanecer (Grima et al., 2004; Stoleru et al., 2004) y la actividad durante todo el día en fotoperiodos cortos (Picot et al., 2007; Stoleru et al., 2007).

Los trabajos mencionados demuestran la capacidad de la red neuronal circadiana de adaptarse a distintas condiciones ambientales y que cada grupo neuronal juega un rol relevante en dicha plasticidad. Sin embargo, existe una clara jerarquía en cuanto a la relevancia de la función de cada grupo neuronal para el control rítmico en ausencia de claves ambientales. El correcto funcionamiento de las LN es necesario y suficiente para generar ritmos robustos de actividad locomotora y eclosión en ausencia de claves ambientales. Moscas que expresan *per* sólo en las LN son rítmicas aunque no con la misma robustez que individuos *wild type* (Frisch et al., 1994). Más aún, el rescate de la expresión de *per* restringido a las LN_v es suficiente para restaurar (parcialmente) la ritmicidad comportamental (Grima et al., 2004). A su vez, la ablación específica de las neuronas LN_v PDF+ resulta en la pérdida del comportamiento rítmico de actividad locomotora (Renn et al., 1999) por lo que las neuronas PDF constituirían el marcapasos circadiano principal.

Múltiples evidencias sugieren que el oscilador central de *Drosophila* se encuentra dentro de las sLN_v . La primera evidencia surge de la observación de la morfología; mientras que las ILN_v envían sus axones hacia el sistema visual, las sLN_v proyectan y liberan PDF hacia el protocerebro dorsal donde contactan con grupos relevantes para el control del comportamiento (Gorostiza et al., 2014; Helfrich-Forster et al., 2007; Shafer et al., 2008). En segundo lugar, varios laboratorios observaron que las oscilaciones moleculares en las ILN_v se

pierden inmediatamente en ausencia de claves ambientales mientras que se mantienen en las sLN_v (Roberts et al., 2015; Shafer et al., 2002). Por otra parte, los niveles de PDF se encontrarían regulados por los factores de transcripción CLK y CYC (Mezan et al., 2016; Park et al., 2000; Sabado et al., 2017) , aunque aún no se ha logrado demostrar que ocurra de forma cíclica (Park and Hall, 1998).

Además de la ritmicidad en ausencia de claves ambientales, el reloj circadiano controla ciertos aspectos del comportamiento en ciclos de luz-oscuridad (LD, fase de entrenamiento). En *Drosophila*, hay una respuesta directa a las transiciones de fase y además anticipaciones de cada una de ellas que se manifiestan como un incremento gradual de la actividad hacia el final del día y hacia el final de la noche (Figura 2). La anticipación al cambio de fase es un aspecto del comportamiento en LD que está controlado por el sistema circadiano, y estaría comandado por dos osciladores distintos; un oscilador M (*morning oscillator*, en inglés) controlaría la anticipación a la mañana y se aceleraría por la acción de la luz, mientras que un oscilador E (*evening oscillator*, en inglés) sería responsable de inducir la actividad de anticipación a la noche y se enlentecería por la acción de la luz (Lamba et al., 2014; Schlichting et al., 2016). Por medio de manipular el reloj molecular o la ablación de distintos grupos neuronales circadianos y luego analizar el comportamiento en LD se ha demostrado que las LN_v PDF⁺ (probablemente sólo las sLN_v PDF⁺) controlan la anticipación de la mañana mientras que la anticipación de la tarde está controlada por las LN_d , DN_1 y posiblemente la 5ta sLN_v PDF⁻ (Grima et al., 2004; Stoleru et al., 2004). Actualmente se entiende que la función como oscilador M o E no estaría necesariamente restringida a ciertos grupos neuronales definidos anatómicamente sino que dependería de las condiciones ambientales de sincronización (Peschel and Helfrich-Forster, 2011).

Las neuronas laterales ventrales, el circuito PDF

Múltiples evidencias sugieren que el oscilador central de *Drosophila* se encuentra dentro de las sLN_v , como lo es la ablación específica de las mismas

resultando en la arritmicidad comportamental (Renn et al., 1999). Entre los mecanismos que se proponen para la transferencia de la información circadiana se destacan la acción del neuropéptido PDF, los cambios diarios de la conectividad de las neuronas PDF y la modulación de la actividad eléctrica del circuito circadiano.

Moscas que no expresan PDF (*pdf⁰*) presentan claras alteraciones de la ritmicidad comportamental (Renn et al., 1999) así como una desincronización en las oscilaciones moleculares en los grupos dorsales (LN_d y DN_1) (Lin et al., 2004; Peng et al., 2003). Por estas razones se ha postulado al neuropéptido PDF como un factor sincronizador del circuito circadiano. Estos mismos fenotipos han sido observados en mutantes para el receptor de PDF (PDFR, *han⁵³⁰⁴*) (Hyun et al., 2005; Im et al., 2011). Como se describió en la sección anterior, las LN_v PDF positivas pueden dividirse en 4 sLN_v y 4 ILN_v . Las sLN_v envían sus proyecciones axonales en forma de un haz fasciculado hacia la región dorsal del cerebro (Helfrich-Forster, 1995, 1997), donde se encuentran las DN_1 y la *pars intercerebralis* (PI), un área compuesta por neuronas del sistema neuroendócrino. Por otro lado, las ILN_v proyectan sus axones fasciculados ipsi-contralateralmente e inervan los lóbulos ópticos (Figura 8).

Si bien tanto las ILN_v como las sLN_v expresan PDF, solo estas últimas tienen un efecto sobre la organización temporal de la actividad locomotora. Esto se evidencia en la comparación del análisis de la actividad locomotora en ausencia de claves ambientales entre *Drosophila melanogaster* y *Drosophila virilis*. Ésta última, a diferencia de *D. melanogaster*, no expresa PDF en las sLN_v pero sí en las ILN_v , y su comportamiento es muy similar al que se observa en los mutantes *pdf⁰¹* (Bahn et al., 2009).

Las sLN_v son consideradas, por lo tanto, el marcapasos central de *Drosophila*. La sola presencia de las proyecciones derivadas de una de ellas en el protocerebro dorsal promueve una actividad locomotora circadiana semejante a la de un individuo silvestre (Helfrich-Forster, 1998). Éstas ponen en fase a la mayoría de los osciladores en el cerebro (Stoleru et al., 2005; Yoshii et al., 2009c) y, como ya se ha dicho, son indispensables para sostener el comportamiento rítmico en oscuridad constante (Grima et al., 2004; Stoleru

et al., 2004). Estas acciones están mediadas en parte por la liberación de PDF, quien comanda la sincronización interna de la red en condiciones de libre curso (Lear et al., 2009; Lin et al., 2004). Se ha visto que la marca inmunoreactiva de PDF oscila en las terminales dorsales de las sLN_v y que esta oscilación depende del control del reloj molecular circadiano (Park et al., 2000). Sin embargo, ni el ARNm, ni la inmunoreactividad de PDF oscilan en el soma, por lo que se asume que diversos mecanismos deben estar gobernando la acumulación y/o secreción de PDF desde las terminales axonales de las sLN_v .

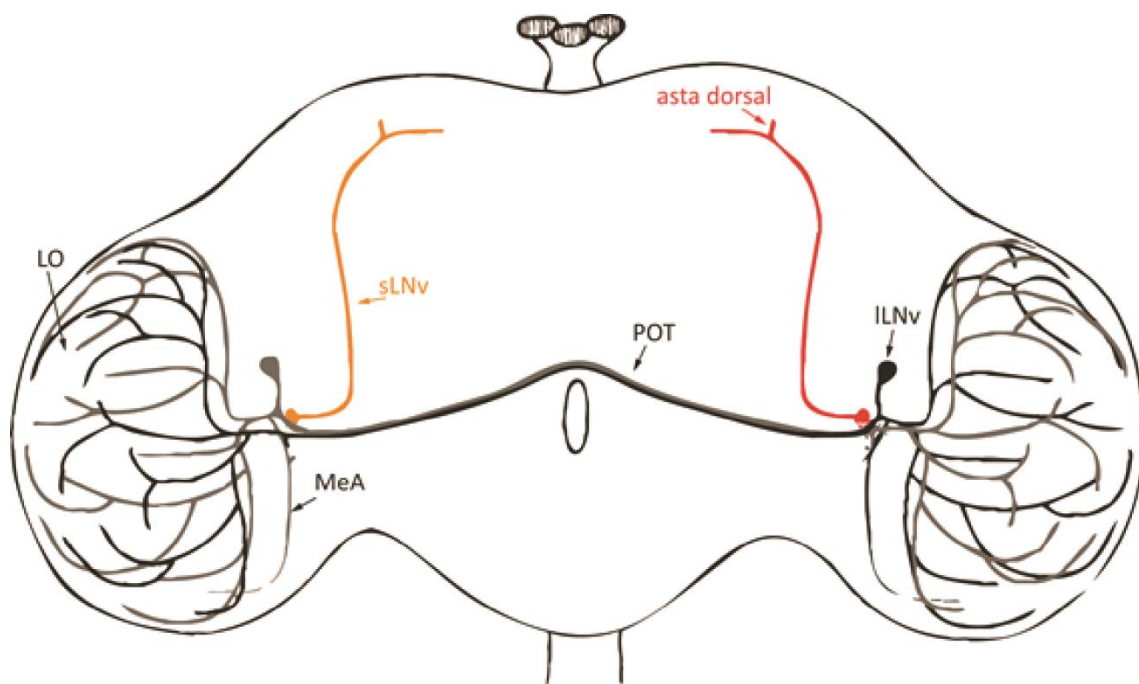


Figura 8: Proyecciones individuales de las LN_v . Se muestran las proyecciones de una sLN_v a cada lado del cerebro (en naranja y rojo). Lo mismo ocurre con las lLN_v (en este caso en gris y negro). POT: tracto óptico posterior; MeA: médula accesoria; LO: lóbulo óptico. Adaptado de (Helfrich-Forster et al., 2007).

Sumado a los cambios en la disponibilidad del neuropéptido, estudios realizados en nuestro laboratorio demostraron que la estructura de las terminales axonales de las sLN_v sufre groseros cambios morfológicos circadianos. Durante la mañana, cuando los niveles del neuropéptido son altos, las terminales axonales se encuentran más desarrolladas, mientras que durante la noche, cuando los niveles de PDF son bajos, la complejidad de las terminales es menor (Fernandez et al., 2008). A este fenómeno lo llamamos plasticidad estructural circadiana (Muraro et al., 2013), cuyos cambios morfológicos podrían implicar cambios diarios en los contactos sinápticos de

las neuronas marcapasos y, en consecuencia, contribuir a la transmisión de la información circadiana (Fernandez et al., 2008).

Plasticidad estructural circadiana

Las oscilaciones en los niveles de PDF no son los únicos cambios circadianos que ocurren en las terminales dorsales de las *sLN_v*. En 2008 nuestro laboratorio demostró que las proyecciones dorsales muestran cambios morfológicos entre el día y la noche (Fernandez et al., 2008). Durante el día las arborizaciones dorsales del circuito se encuentran en una configuración más compleja, caracterizado por un aumento en el número de neuritas o la desfasciculación de las existentes, y lo denominamos como un circuito “abierto” o complejo. Por la noche, por el contrario, las arborizaciones pierden esa complejidad y adoptan una configuración denominada como “cerrada” (Figura 9). Esta oscilación en la estructura no puede evidenciarse en mutantes para proteínas centrales del reloj, como *per⁰¹* y *tim⁰¹* (Fernandez et al., 2008), lo cual indicaría que es un fenómeno controlado por el reloj biológico (Figura 10).

Estos cambios en la complejidad de las terminales de las *sLN_v* pueden ser cuantificados de una manera relativamente sencilla utilizando una modificación del análisis de *Sholl* (Sholl, 1953), mostrando más entrecruzamientos axonales por la mañana y menos entrecruzamientos axonales por la noche (Figura 9A).

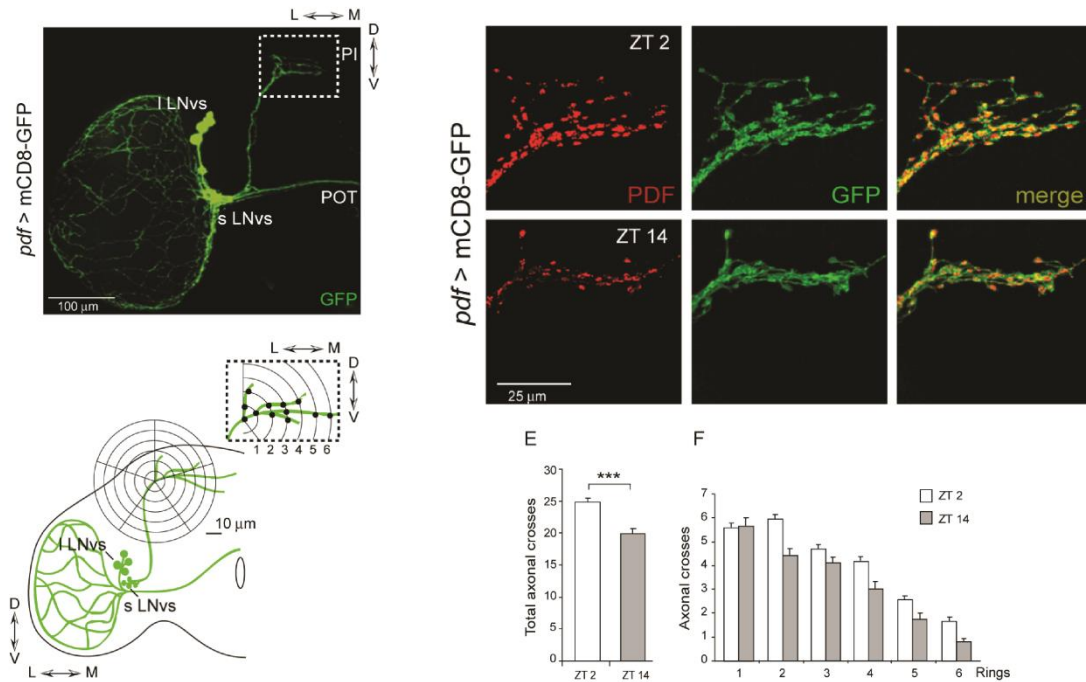


Figura 9: Remodelación axonal diaria de las terminales dorsales de las neuronas PDF. **A.** Método de medición de la complejidad axonal. Imagen confocal de un hemicerebro en donde la membrana de las neuronas PDF está marcada por la expresión de CD8GFP. La región de análisis está delimitada con línea punteada (arriba). Diagrama explicando el método de cuantificación de la complejidad de la estructura (abajo). **B.** Imágenes de confocal representativas tomadas durante el principio de la mañana (ZT2) y el principio de la noche (ZT14) mostrando la oscilación en la señal del neuropéptido PDF (rojo) así como los cambios estructurales (verde), y el merge entre ambas. **C.** El número total de intersecciones entre los anillos concéntricos y las proyecciones axonales es significativamente distinto entre animales salvajes disectados durante el día (ZT2) y la noche (ZT14). **D.** La complejidad de las arborizaciones axonales es consistentemente menor a lo largo de toda la proyección en la configuración nocturna. Modificado de (Fernandez et al., 2008).

La plasticidad estructural de las neuronas PDF no es una respuesta directa a los ciclos de luz/oscuridad sino un verdadero fenómeno regulado por el reloj endógeno puesto que sigue ocurriendo en ausencia de claves ambientales, y desaparece en mutantes canónicos del reloj (Figura 10). Además, este tipo particular de plasticidad estructural persiste a lo largo de los días y no está restringido sólo a individuos recién eclosionados (incluso animales de 2 semanas de edad presentan remodelamiento axonal circadiano de las neuronas PDF) y no hay dimorfismo sexual evidente (Fernandez et al., 2008).

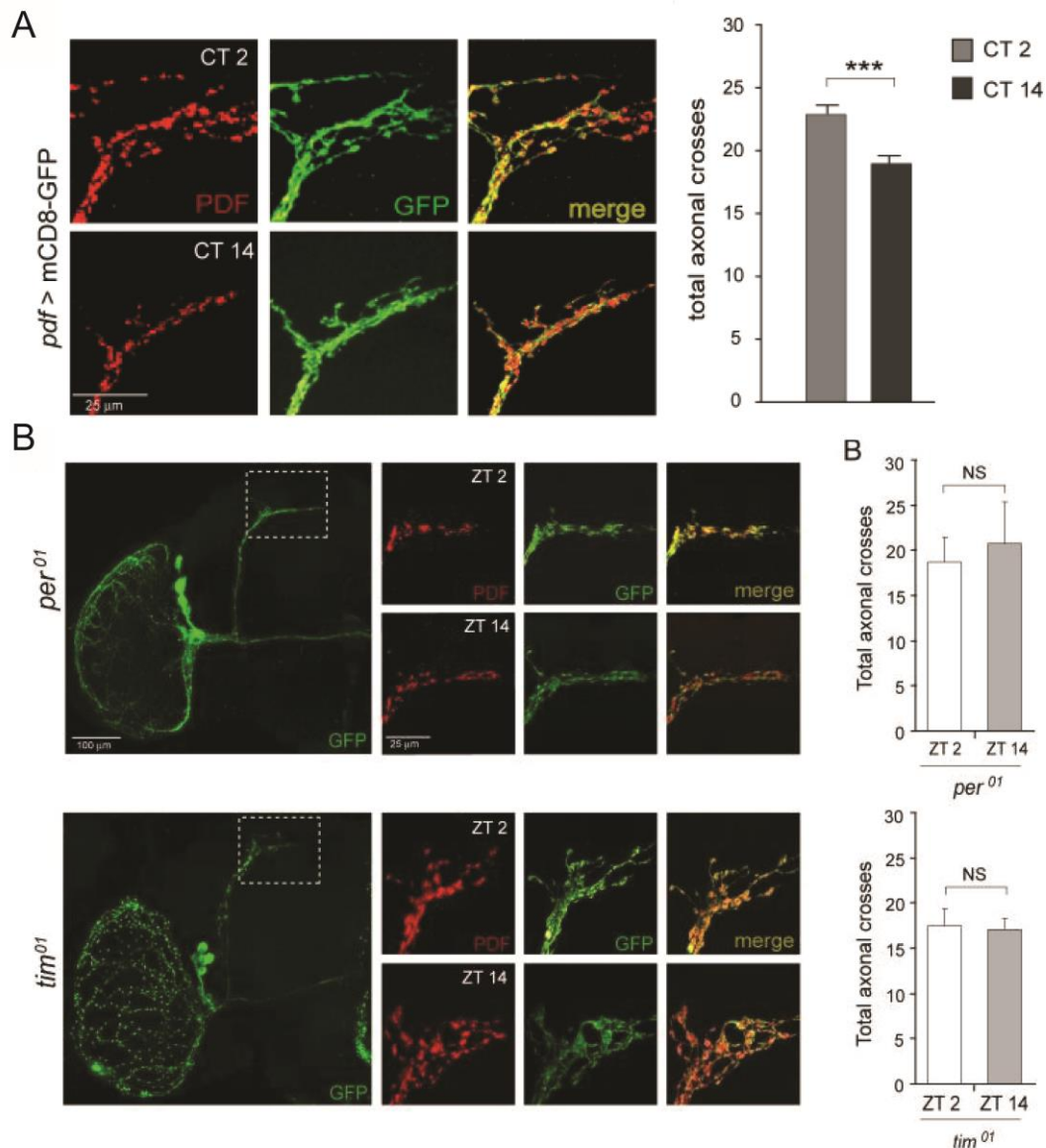


Figura 10: El remodelamiento axonal de las sLN, es un fenómeno controlado por el reloj circadiano. **A.** Los cambios en el grado de ramificación están preservados en ausencia de claves ambientales. Imágenes de microscopio confocal representativas de cerebros disectados al principio del día subjetivo (CT2) y de la noche subjetiva (CT14) y teñidos con anti-PDF (rojo) y anti-GFP (verde) (izquierda). El número de entrecruzamientos totales es significativamente mayor a CT2 respecto a CT14 (derecha). **B.** Mutantes del reloj no presentan plasticidad estructural. Mutantes nulos de *per* (*per*⁰¹) y de *tim* (*tim*⁰¹) no muestran diferencias significativas en el número total de entrecruzamientos al inicio de la mañana (ZT2) y el inicio de la noche (ZT14). Modificado de (Fernandez et al., 2008).

Son solo contados los estudios que describen este fenómeno regulado por el reloj endógeno (Fernandez et al., 2008). Llamativamente el máximo de complejidad reportado coincide con el pico de máxima depolarización de estas neuronas (Cao and Nitabach, 2008; Cao et al., 2013). A su vez se demostró que afectarla a través de la expresión de un canal rectificador de potasio, *KIR*,

resulta en la pérdida parcial de la remodelación circadiana, con circuitos de una configuración poco compleja (Depetris-Chauvin et al., 2011). Todo esto indica que es un fenómeno que no sólo depende del correcto funcionamiento del reloj molecular, sino también de la actividad eléctrica neuronal.

Aunque hace algunos años se reportó que estos cambios diarios en las terminales de las *sLN_v* resultan de cambios en el grado de fasciculación regulados por el factor de transcripción *Mef2* (Sivachenko et al., 2013). Adicionalmente, se ha demostrado que la remodelación depende de cambios en el citoesqueleto de actina (Petsakou et al., 2015). En este sentido, la plasticidad estructural es un fenómeno de gran complejidad que compromete cambios en el número de sinapsis, en la densidad de fibras axonales, en el patrón de arborización de axones y dendritas, en los patrones de conectividad sináptica e incluso cambios en el número de células dados en la neurogénesis adulta (Butz et al., 2009).

Más aún, hace algunos años nuestro laboratorio demostró que la desregulación específica en estadios adultos de los niveles de las metaloproteasas de matriz MMP1 y MMP2, particularmente en las *sLN_v*, interrumpe el fenómeno de plasticidad estructural, aunque solo MMP1 afecta los niveles de PDF en las terminales de estas neuronas. Esto se confirmó con experimentos *in vitro*, donde se observó que MMP1 tiene la capacidad de clivar a PDF (Depetris-Chauvin et al., 2014). Curiosamente, se encontró que la disminución directa de los niveles de PDF a través de la expresión de un ARN de interferencia de forma adulto-específica, provoca la pérdida de la remodelación estructural circadiana (Depetris-Chauvin et al., 2014). Todo esto indica que estas oscilaciones en los niveles de PDF que ocurren en las terminales dorsales de las *sLN_v* están íntimamente relacionadas con los cambios morfológicos diarios que se dan en las mismas. Es por esto que resulta de gran interés poder ahondar en esta relación, ya que conforman las dos vías de salida preponderantes de las *sLN_v*s.

La vía de señalización del neuropéptido PDF

La señal de PDF actúa por medio de su receptor PDFR (Lear et al., 2005; Mertens et al., 2005), una proteína expresada en alrededor de la mitad de las neuronas reloj (Im and Taghert, 2010). PDFR es una proteína transmembrana acoplada a una proteína G ($G\alpha$) cuya activación conlleva a un incremento de los niveles de AMP_c (Hyun et al., 2005; Mertens et al., 2005). En respuesta a aplicación exógena de PDF se observa un aumento de AMP_c en varias de las neuronas reloj, implicando que gran parte de la red circadiana, incluidas las propias sLN_v pero no las lLN_v , podría responder al neuropéptido (Shafer et al., 2008). Más recientemente se ha descrito que el neuropéptido PDF señala a través de distintas adenilato ciclasas (AC) en diferentes grupos neuronales (Duvall and Taghert, 2012); de esta forma, la información circadiana provista por el neuropéptido podría ser leída por las neuronas PDFR+ de forma distinta y activar diferentes cascadas de señalización río abajo del mismo receptor.

La señalización de PDF opera a través de dos mecanismos para regular el comportamiento circadiano: a través de una vía que resetea el reloj, donde se marca a TIM via PKA para mantener la sincronía/poner en hora las oscilaciones moleculares en distintos grupos de neuronas reloj; y potencialmente modulando la actividad de un canal activable por AMP_c , que modularía la excitabilidad, al menos de algunos grupos de neuronas reloj; este último es independiente de PKA (Seluzicki et al., 2014) (Figura 11), pero también podría impactar en el nivel de expresión de genes controlados por el reloj (Mizrak et al., 2012). Se ha demostrado que la expresión de una forma activada de PKA puede rescatar la mayoría de los fenotipos de los mutantes de *pdf*, evidenciando que PKA está mediando la señalización de PDFR en la red circadiana.

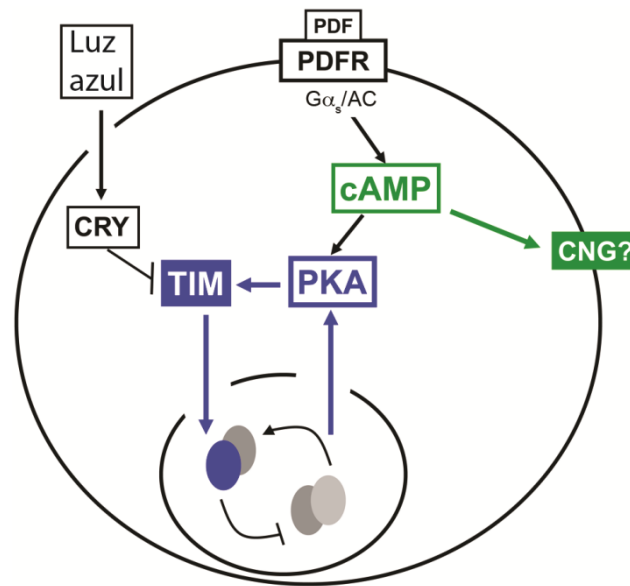


Figura 11: Modelo de la bifurcación en la vía de señalización de PDF/PDFR en el control del reloj molecular y la excitabilidad neuronal. PDFR actúa a través de proteínas G y adenilato ciclasa (AC) para incrementar los niveles de AMP_c, lo cual activa directamente un canal de bloqueo cíclico de nucleótidos (en inglés *cyclic-nucleotide-gated channel*, *CNG channel*) (vía color verde) para depolarizar de forma aguda la célula e incrementar los disparos de potencial de acción (aumento en la actividad eléctrica). El AMP_c también activa a PKA, promoviendo la estabilidad de TIM y su participación en el reloj molecular (vía color azul). La luz azul activa a CRY, que a su vez promueve la degradación de TIM. El reloj molecular además controla la transcripción de PKA, para así controlar la transducción de señales al reloj a través de un mecanismo de retroalimentación. Modificado de (Seluzicki et al., 2014).

Las neuronas reloj controlan rítmicamente su sensibilidad a PDF, sugiriendo que la expresión rítmica de AMP_c debido a PDF y la transcripción rítmica de PKA colaboran para establecer una señal momento del día específica para así sincronizar osciladores PDF de no-PDF (Seluzicki et al., 2014).

La glia en el sistema nervioso de *Drosophila*

Las células gliales del cerebro, en particular astrocitos y microglia, secretan moléculas que regulan la comunicación glia-glia o glia-neurona y, por lo tanto, la actividad sináptica. Hay evidencia que muestra que las células gliales tienen roles críticos en la modulación de la transmisión sináptica, en la plasticidad y el comportamiento, además de su caracterizada función en el desarrollo de la sinápsis y la neurodegeneración (Brown and Neher, 2014; Clarke and Barres, 2013; Stork et al., 2012). Estudios recientes en *Drosophila* han implicado el funcionamiento de la glia en la regulación de la excitabilidad

neuronal (Melom and Littleton, 2013; Rusan et al., 2014), en la visión (Borycz et al., 2002; Chaturvedi et al., 2014; Stuart et al., 2007), en el comportamiento circadiano (Ng et al., 2011; Suh and Jackson, 2007), en el sueño (Chen et al., 2015; Seugnet et al., 2011), en sensibilidad comportamental a drogas (Bainton et al., 2005) y en olfacción (Liu et al., 2014).

Glia y comportamiento circadiano

Mientras que se sabe muy poco de gliotransmisores en *Drosophila*, contamos con amplia evidencia de los roles de las células gliales en la modulación de la ritmicidad del comportamiento circadiano. Varios estudios han documentado la expresión rítmica de proteínas reloj y otras proteínas neuronales en la glia del cerebro adulto de *Drosophila* (como PER, TIM, Ebony, CREB2, Na⁺/K⁺-ATPasa) (Damulewicz et al., 2013; Suh and Jackson, 2007; Tanenhaus et al., 2012; Zerr et al., 1990). El uso de herramientas genéticas en *Drosophila* ha revelado que la glia es un elemento crítico para los circuitos neuronales que subyacen al comportamiento circadiano y el sueño (Chen et al., 2015; Ng et al., 2011; Seugnet et al., 2011).

La primera evidencia directa de un rol para la glia de *Drosophila* en la actividad comportamental circadiana fue el análisis de *ebony* (Suh and Jackson, 2007), una sintetasa peptídica no ribosomal específica de glia que juega un papel en el reciclado de neurotransmisores aminérgicos (Borycz et al., 2002). Suh y Jackson (2007) revelaron que *ebony* tiene un ritmo circadiano en las células gliales del cerebro adulto, que no depende de PDF. Además los autores muestran que muchas de las células de la glia que expresan Ebony también muestran expresión rítmica de *per* y *tim*, lo que es indicativo de una función reloj, y es consistente con trabajos previos que demuestran la presencia de relojes basados en PER/TIM en la glia del adulto (Zerr et al., 1990). Asimismo, estudios genéticos tejido-específicos demuestran que se requiere a Ebony en la glia para la normal ritmicidad comportamental. Análisis posteriores indican que la mayor parte de las células de la glia que expresan

Ebony son astrocitos, involucrando a este subtipo de células gliales en la ritmicidad comportamental.

La glia y el circuito PDF

Los estudios que demuestran que la glia puede modular el comportamiento en *Drosophila* (Ng et al., 2011) se basaron en la expresión de un canal de sodio bacteriano (NaCHBac) o de una variante mutada de dinamina sensible a temperatura, que funciona como dominante negativa (*shi^{TS}*) para alterar la exocitosis/endocitosis específicamente en la glia, lo cual resultó en la pérdida de la ritmicidad comportamental, exclusivamente al interferir con este proceso en astrocitos y no así en otros subtipos gliales. Esto demuestra que, de forma similar a los mamíferos, en *Drosophila* los astrocitos son importantes reguladores del comportamiento en el adulto.

Un hallazgo importante de estos estudios es que las perturbaciones generadas por *shi^{TS}* tienen efectos reversibles en la ritmicidad comportamental; es decir, a temperaturas en las que la mutante interfiere con el reciclado vesicular, se observan claros efectos en los patrones de actividad, que se recuperan una vez que los individuos son transferidos a temperaturas en las que la mutante no es activa, en fase con la correspondiente a la condición de sincronización. Esta reversibilidad y ausencia de un corrimiento de fase sugieren que la glia modula rutas de salida del reloj, sin afectar el reloj *per se*. Confirmando esto, se ha demostrado que la pérdida de función de la glia de forma adulto-específica (con *shi^{TS}* a altas temperaturas) no afecta el estado del reloj molecular neuronal, ni la viabilidad de neuronas o astrocitos, pero correlaciona con niveles alterados (elevados) de PDF dentro de las terminales axonales de las sLN_v (detectado por inmunoreactividad), que son reversibles una vez alcanzado el estado original. Más recientemente se ha demostrado que disminuir los niveles de un factor que bloquearía la exocitosis exclusivamente en la glia, provoca la pérdida de la ritmicidad y una disminución en los niveles de PDF en las proyecciones de las sLN_v (Ng et al., 2016).

Estos resultados comportamentales y moleculares sugieren que los astrocitos del cerebro adulto de *Drosophila* secretan al menos un factor vesicular que regula rutas de salida del reloj neuronal (Figura 12).

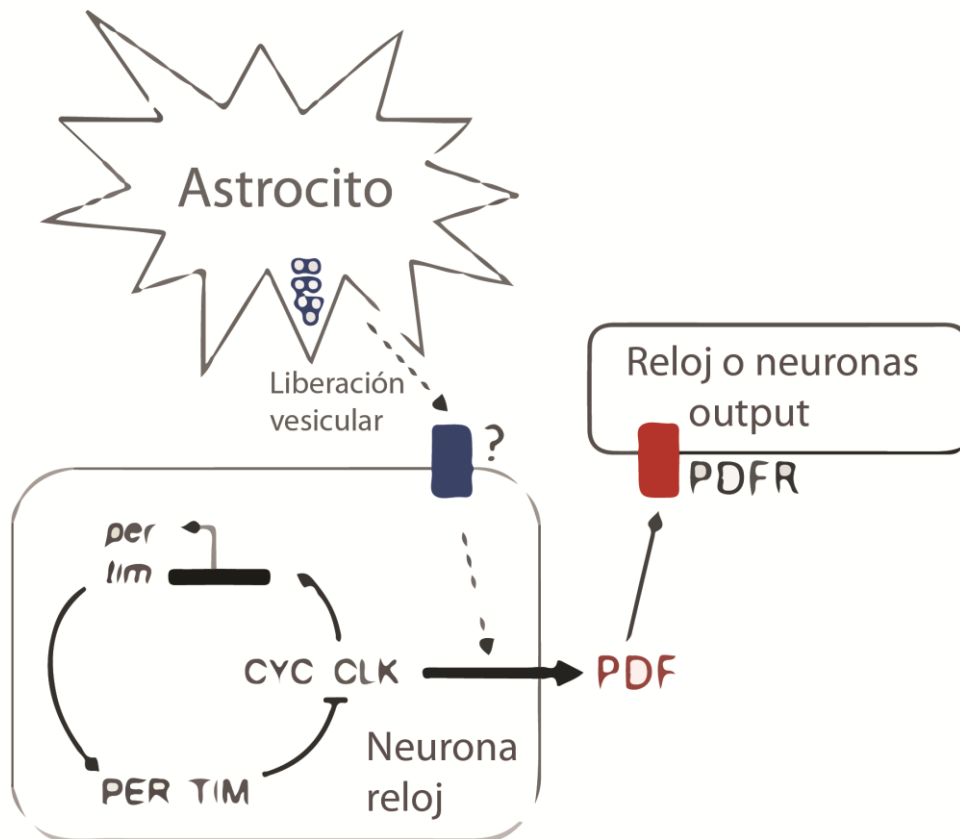


Figura 12: Modelo esquemático que ilustra la interacción glia-neurona dentro del sistema circadiano de *Drosophila*. PDF actúa en receptores acoplados a proteínas G (clase II, familia B), los cuales se encuentran presentes en neuronas de la red circadiana para coordinar relojes neuronales. Se representa la regulación de la fisiología de una neurona circadiana por un astrocito. El rectángulo azul representa un receptor o transportador hipotético que media los efectos del factor glial liberado. Las líneas punteadas indican la presencia de elementos o rutas indefinidas involucradas en la comunicación glia-neurona que regula a PDF río abajo del reloj molecular. Modificado de (Jackson et al., 2015).

Objetivos e hipótesis

Hace unos años se describieron cambios a lo largo del día en la morfología de las proyecciones de un grupo central de “neuronas reloj”, fenómeno denominado “plasticidad estructural circadiana”. Puesto que estas neuronas (conocidas como neuronas sLNv o PDF porque liberan el neuropéptido *pigment dispersing factor*) cumplen un papel fundamental en el circuito que controla los ciclos de actividad y reposo en la mosca adulta se planteó la posibilidad que la plasticidad estructural contribuya a dicha ritmicidad. La presente tesis doctoral se centró en caracterizar los mecanismos moleculares que subyacen a este fenómeno. En ese contexto, los objetivos particulares/específicos son:

- Evaluar si la plasticidad estructural es regulada por el reloj de forma autónoma de célula. Puesto que un sinnúmero de procesos circadianos están bajo el control directo de la maquinaria del reloj, es esperable que el reloj presente en las sLNvs sea necesario y suficiente para disparar los cambios en la morfología de las terminales.
- Definir si otros relojes, por ejemplo los presentes en la glia, contribuyen a la remodelación.
- Ahondar en el rol de PDF, y particularmente, la posibilidad que medie parte de la remodelación en forma dependiente del momento del día.
- Analizar la relación entre los niveles de PDF, el fenómeno de plasticidad estructural y cambios en la excitabilidad de las neuronas LNvs..

Estos objetivos tienen como finalidad corroborar las siguientes hipótesis de trabajo:

- La plasticidad estructural es un fenómeno que depende de un reloj autónomo de célula.
- El neuropéptido PDF juega un papel autónomo de célula.
- PDF tiene un rol diferencial en la remodelación de las terminales de las sLNvs en momentos particulares del día.

Materiales y métodos

1. Líneas de *Drosophila* empleadas

1.1. *Mantenimiento de Stocks*

Se utilizaron dos sistemas distintos para el criado y mantenimiento de las moscas. Los cruzamientos y el mantenimiento de los stocks se realizaron en viales de plástico de 2 cm de diámetro y 10 cm de altura conteniendo medio de cultivo a base de polenta, sacarosa, agar, levadura, nipagín y ácido propiónico. Para el criado a mayor escala se utilizaron botellas de plástico de 250 ml (Genesee Scientific) con aproximadamente 50 ml del mismo medio de cultivo. En los experimentos en donde se utilizó la línea pdfGS se suprimió el agregado de ácido propiónico en el medio de cultivo para evitar que el cambio de pH pudiese afectar la acción de la droga inductora.

Los stocks y las botellas para la recolección de moscas fueron mantenidos en un cuarto a 18 °C. El laboratorio cuenta también con 8 incubadoras que permiten controlar las condiciones de luz, temperatura y humedad. Los cruzamientos fueron mantenidos en estas incubadoras a 25 °C y en ciclos de 12 horas de luz y 12 de oscuridad.

Para seleccionar individuos según sexo, presencia o ausencia de cromosomas balanceadores, color de ojos, etc., las moscas se observaron bajo la lupa sobre una plataforma porosa a través de la cual se filtra CO₂, que en *Drosophila* tiene efecto anestésico. En los casos donde fue necesario seleccionar individuos en ausencia de claves ambientales (oscuridad constante) se utilizó luz roja que no es percibida por las moscas. Los cruzamientos normalmente consistieron en 3 hembras por cada 2 machos. En general se agregó una pequeña cantidad de levadura en polvo a cada vial para optimizar la ovipuesta.

1.2. *Nomenclatura de Drosophila*

Drosophila es un organismo diploide que cuenta con un par de cromosomas sexuales (el par 1 que es, XX en hembras y XY en machos) y 3 autosomas (el par 2, 3 y 4). El cromosoma Y suele presentar estructura heterocromática por lo que no expresa muchos genes. De los 3 autosomas, el

cuarto es muy pequeño, contiene muy pocos genes y por eso muchas veces es ignorado.

En *Drosophila* el genotipo de cada mosca se escribe de una manera estandarizada. El detalle de cada cromosoma se separa con punto y comas “;”, y de izquierda a derecha se nombra desde el par 1 al 4. Cromosomas homólogos se separan por una barra inclinada / y los cromosomas que corresponden a cada parental se colocan ordenados hacia la izquierda y la derecha de dicha barra. Si el genotipo de un cromosoma es el mismo para ambos parentales, se lo indica sólo una vez sin poner la barra. Por otra parte, si el genotipo para un cromosoma es salvaje se indica con un +. Si el genotipo de los pares de cromosomas “hacia los extremos” es salvaje no se indica en el genotipo para resumir. A continuación se presenta un ejemplo de genotipo extendido y resumido.

Cromosoma				
X	II	III	IV	
+/+;	<i>pdf</i> -GAL4/ <i>pdf</i> -GAL4;	UAS-CD8GFP/UAS-CD8GFP;	+/+	Genotipo extendido
<i>pdf</i> -GAL4;UAS- <i>CD8GFP</i>				Genotipo resumido

Tabla 1: Diferentes formas de escribir los genotipos en *Drosophila melanogaster*.

A su vez, cuando se quiere indicar más de un gen o transgen en un mismo cromosoma se indica separando con una coma. En el ejemplo presentado a continuación los transgenes *pdf*-GAL4 y UAS-CD8GFP se encuentran en el mismo cromosoma (II del mismo parental) mientras que el transgen UAS-CLK se encuentra en el par homólogo (II pero del otro parental):

pdf-GAL4,UAS-CD8GFP/UAS-CLK

Por último, los genes se escriben en minúscula e itálica (*gen*) mientras que las proteínas se indican en mayúscula y letra regular (PROTEÍNA).

1.3. Cromosomas balanceadores y generación de líneas

Una de las herramientas más útiles del repertorio disponible para el análisis mediante enfoques genéticos de *Drosophila* son los cromosomas balanceadores, ya que impiden la pérdida de mutaciones de interés por recombinación y facilitan la combinación de elementos transponibles. Están

formados por múltiples inversiones, lo que determina que tengan una baja probabilidad de recombinación homóloga. Suelen contar además con mutaciones que les atribuyen marcadores fenotípicos dominantes facilitando el análisis de segregación en la progenie. Además, en general poseen mutaciones letales recesivas, lo que impide que en la progenie se obtengan individuos homocigotas para el balanceador. La ventaja de esto es que permite la construcción y el mantenimiento de líneas que portan mutaciones letales en homocigocis. En el transcurso de esta tesis se utilizaron los cromosomas balanceadores CyO (II), SM6(II), TM3 (III) y TM6b (III). Además, la línea DB (*double balancer*), que posee los balanceadores CyO y TM3 sobre un marcador denominado ES, que es una fusión entre el segundo y tercer cromosoma.

Gracias a dichos cromosomas balanceadores es posible combinar fácilmente mutaciones que están en distintos cromosomas (generando líneas denominadas comúnmente “dobles homocigotas”). Por otra parte, también es posible combinar mutaciones que se encuentren en el mismo cromosoma (generando “líneas recombinantes”).

1.4. El sistema GAL4/UAS y el sistema GeneSwitch

El sistema heterólogo proveniente de levadura UAS-GAL4 es una herramienta muy útil para dirigir la expresión de un gen de interés en un tejido determinado (Brand and Perrimon, 1993). La base de este sistema es la afinidad del factor de transcripción GAL4 por la secuencia UAS (Upstream Activating Sequence). Una línea que expresa GAL4 bajo un promotor específico de tejido (Promotor), denominada línea inductora, se cruza por otra que expresa un gen X bajo la secuencia UAS (línea UAS-genX); entre la progenie, sólo en aquellos individuos que posean ambas construcciones se expresará el gen X bajo el promotor específico deseado (Figura 13).

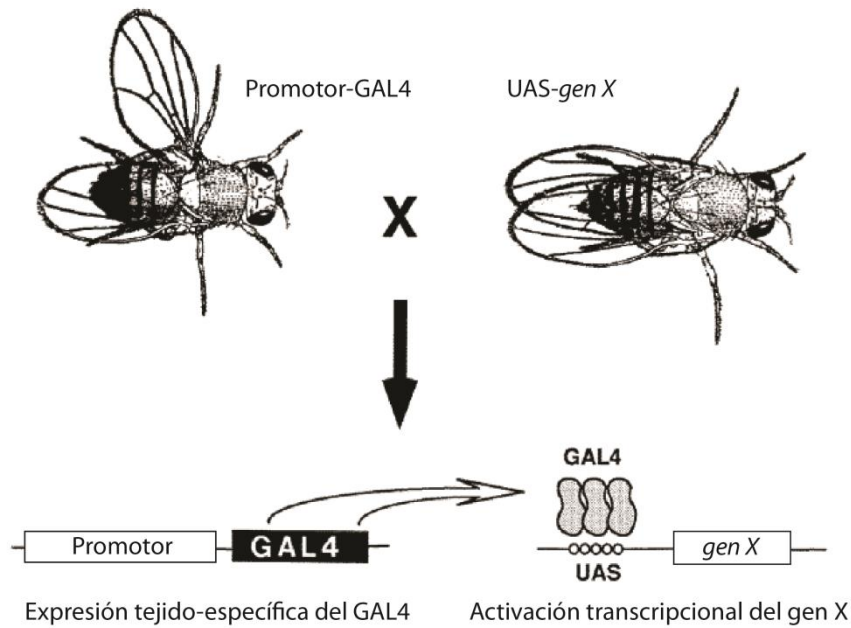


Figura 13: Esquema del funcionamiento del sistema heterólogo UAS-GAL4. Dos líneas transgénicas, una portando una construcción que alberga el promotor específico deseado controlando la expresión del factor de transcripción GAL4, y otra cuya construcción porta la secuencia UAS controlando el gen X, se cruzan para obtener en la progenie moscas que expresen el gen X en el patrón espacial y temporal del promotor utilizado. Modificado de (Brand and Perrimon, 1993).

Además de la inducción tejido específica en ocasiones es necesario regular temporalmente la expresión de genes o transgenes. En *Drosophila* existen diversos sistemas de expresión inducibles basados en drogas inductoras o en moléculas represoras de la actividad de GAL4, inactivables por temperatura. En esta tesis utilizamos dos de ellos, el sistema *GeneSwitch* basado en la activación con drogas análogas a la progesterona (Osterwalder et al., 2001), y el sistema termosensible, llamado TARGET, inducible por temperatura (McGuire et al., 2004). El sistema *GeneSwitch* (GS) es una fusión del dominio de reconocimiento al ADN de GAL4 al dominio de unión al ligando del receptor de progesterona humana. La unión de progesterona, o de análogos como el esteroide RU486 (*mifepristone*, Sigma, USA), activa el GAL4 permitiendo la activación de genes río abajo de la secuencia UAS (Figura 14).

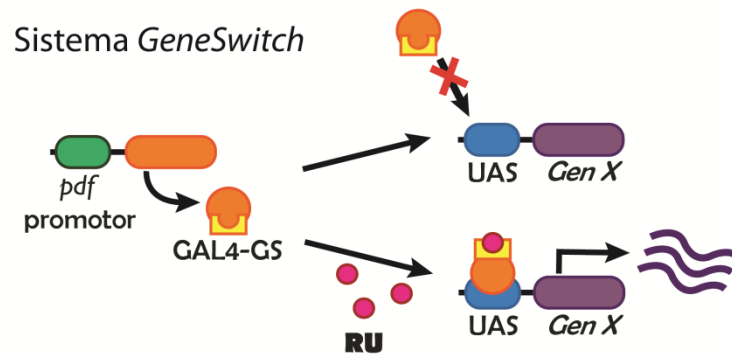


Figura 14: Esquema del funcionamiento del sistema inducible *GeneSwitch*. En ausencia de inductor los animales que presentan ambos transgenes (Promotor-GAL4 y UAS-genX) no activan la transcripción de los genes río debajo de la secuencia UAS. En cambio, cuando se agrega el inductor RU al sistema el gen X se expresa en el patrón espacial y temporal del promotor utilizado.

En el sistema termosensible, inducible por temperatura, como su nombre lo indica, se basa en la expresión conjunta del factor de transcripción GAL4 y su represor, el factor de transcripción GAL80^{TS}. A temperaturas bajas (20-22°C) el GAL80^{TS} está activo y reprime la actividad del GAL4, impidiendo así la transcripción de genes controlados por UAS. Pero a temperaturas altas (28-30°C), el GAL80^{TS} sufre cambios conformacionales y se inactiva, permitiendo la unión del GAL4 a la región UAS, y la transcripción del gen de interés (Figura 15).

Sistema termosensible

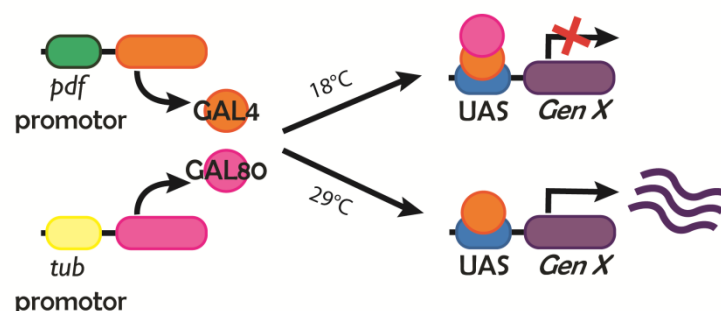


Figura 15: Esquema del funcionamiento del sistema inducible termosensible. A temperaturas bajas el factor de transcripción GAL80 reprime la actividad del GAL4, mientras que a temperaturas altas deja de ser funcional permitiendo la unión del GAL4 a la región UAS, para que ocurra la transcripción del gen de interés X.

1.5. Inducción de los sistemas de expresión en larvas, pupas y adultos

Para la inducción del sistema *GeneSwitch* en adultos, se mezcló la droga RU486 (*mifepristone*, Sigma, USA) disuelta en etanol 80% en la comida hasta llegar a una concentración final de 200 µg/ml. En los experimentos de inducción aguda del *pdf^{RNAi}* (por 24hs) se utilizaron 500 µg/ml para aumentar el grado de inducción del sistema. En los controles sin inducción se reemplazó la droga por la misma cantidad de etanol (Vehículo).

Para la inducción a través del sistema termosensible, se mantuvieron los cruzamientos a 18°C hasta la emergencia de los adultos, para así mantener al sistema inactivo y no afectar al desarrollo. Una vez obtenidos los individuos adultos (de al menos 48hs) del genotipo deseado, se los transfirió a 30° para inactivar al GAL80.

1.6. Stocks utilizados

1.7.

Genotipo	Procedencia	Cromosoma
Líneas controles y Balanceadoras		
w1118	Bloomington Stock Center	
dB: y+;CyO;TM3/ES	Generada en el laboratorio	
SM6;TM6YFP/ES	Generada en el laboratorio	
<i>pdf-dsRed</i>	Dr. Justin Blau	II y III
Líneas inductoras		
<i>pdf-GS</i>	Generada en el laboratorio	III
<i>pdf-GAL4</i>	# 6900 Bloomington Stock Center	II
<i>pdfR-GAL4</i>	Dra. Leslie Griffith (Brandeis Univ.)	II
<i>tub-GAL80^{TS}</i>	#7017 Bloomington Stock Center	III
<i>tim-GAL4</i>	#7126 Bloomington Stock Center	II
c929-GAL4	#25373 Bloomington Stock Center	II
<i>sLN_v-GAL4</i>	Dr. Taishi Yoshii	II
<i>repo-GAL4</i>	#7415 Bloomington Stock Center	II
Líneas UAS		
UAS- <i>CD8GFP</i>	Bloomington Stock Center	II

UAS- <i>myrRFP</i>	Dr. Henry Chang (Purdue University)	III
UAS- <i>Dicer2</i>	Vienna Drosophila RNAi Center (VDRC)	II y III
UAS- <i>pdf</i>	Dr. Paul Taghert (Washington University)	II
UAS- <i>pdf</i> ^{RNAi}	#4380 Vienna Drosophila RNAi Center (VDRC)	III
UAS- <i>pdf</i> ^{RNAi}	#38347 Bloomington Stock Center	II
UAS- <i>TrpA1</i>	#26263 Bloomington Stock Center	II
UAS- <i>per</i> ^{RNAi}	#40878 Bloomington Stock Center	III
	#31285 Bloomington Stock Center	III
UAS- <i>tim</i> ^{RNAi}	#29583 Bloomington Stock Center	II
	#2886 Vienna Drosophila RNAi Center (VDRC)	III
UAS- <i>clk</i>	Dr. Ravi Allada (Northwestern University)	II
UAS- <i>cyc</i> ^{DN}	#36317 Bloomington Stock Center	II

Tabla 2: Líneas de moscas utilizadas en el transcurso de esta tesis. Se detalla también la procedencia y el cromosoma en donde se encuentra la inserción del transgen. Cuando se indica más de un cromosoma es porque se utilizaron líneas con inserciones en uno y otro cromosoma.

2. Análisis de la actividad locomotora

2.1. Análisis automatizado de la actividad locomotora

El monitoreo de la actividad locomotora se realizó colocando machos individuales en tubos de 0,5 cm de diámetro y ~6 cm de largo en uno de cuyos extremos hay comida. Se cuenta con monitores con capacidad para 32 tubos (*Trikinetics*, Waltham, MA); cada posición está flanqueada por un haz de luz infrarroja imperceptible para las moscas. Cada vez que una mosca interrumpe el haz de luz se registra un dato. La actividad locomotora (número de veces que la mosca interrumpió el haz) se registró cada 1 minuto durante todo el experimento obteniéndose un registro diario de cada individuo a lo largo del experimento (alrededor de 12 días). Dicha información fue luego importada a un programa de análisis (*Clocklab*, *Actimetrics*, IL) en el cual se visualiza la actividad a lo largo de los días en forma de actograma. Los experimentos consistieron en un entrenamiento de 3-4 días en incubadoras con condiciones

controladas de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (fase de LD) a 25 °C, y luego se los dejó en condiciones de oscuridad constante por al menos 9 días más (fase de DD) (Figura 16).

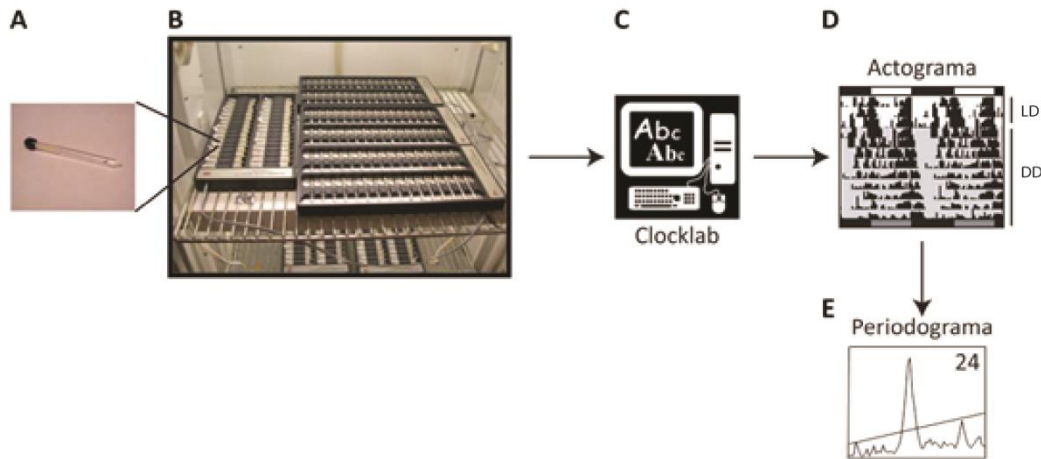


Figura 16: Esquema del proceso de adquisición de datos para los experimentos de actividad locomotora. A. Tubos donde se cargan las moscas individuales. B. Monitores de actividad locomotora dentro de una incubadora que controla la temperatura y las condiciones de luz y oscuridad. C. Procesamiento de los datos con el software *Clocklab*. D. Obtención de los actogramas de actividad individual. LD: ciclos de 12 hs de luz (barras claras) y 12 de oscuridad (barras oscuras). DD: oscuridad constante. Las barras grises en la fase de DD representan el día subjetivo. El fondo gris indica los días en DD. E. Periodograma obtenido por análisis de Chi cuadrado con el software *Clocklab*.

El periodo de actividad de cada mosca se analizó en la fase de DD utilizando el mismo programa de análisis realizando un Chi-cuadrado con una significancia de 0,05 (Sokolove and Bushell, 1978). Según el periodograma obtenido los individuos se clasifican como rítmicos, débilmente rítmicos o arrítmicos (Figura 17).

Se calculó el porcentaje de ritmicidad para cada genotipo en un determinado experimento como el número de moscas rítmicas según el análisis de periodograma sobre el total de moscas analizadas. Para el análisis de ritmicidad de cada genotipo se realizaron al menos 3 experimentos de actividad locomotora independientes. La determinación del periodo se realizó para cada mosca individual y se consideró el promedio por condición en cada experimento. La unidad experimental fue, entonces, tanto para la variable “porcentaje de ritmicidad” como “periodo”, un experimento independiente.

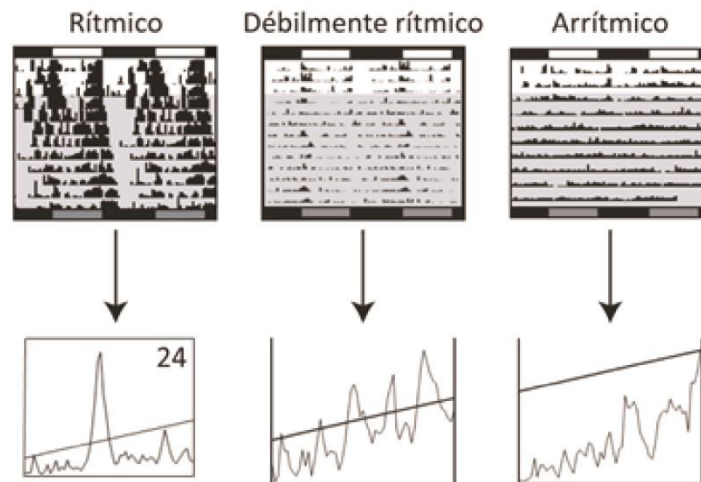


Figura 17: Actogramas (arriba) y periodogramas (abajo) representativos de moscas rítmicas, débilmente rítmicas y arrítmicas. En el caso de los rítmicos, los datos ajustan a una función con un único periodo dentro de un rango esperado (12 a 40 horas). En los débilmente rítmicos el periodo encontrado apenas pasa la línea de significancia o bien varios picos la atraviesan. Los arrítmicos corresponden a individuos donde el programa no identifica periodicidad alguna o lo hace en rangos fuera de lo esperado.

3. Técnicas de biología molecular

3.1. *Análisis de presencia de elementos transponibles en líneas recombinantes*

Para confirmar la presencia de elementos transponibles en algunas de las líneas recombinantes generadas en el transcurso de esta tesis se realizó la reacción de PCR sobre ADN genómico de individuos potencialmente recombinantes levantando específicamente alguno de los transgenes presentes en dicha línea. Para la línea recombinante ;;*tub-Gal80TS,UAS-dcr2* se analizó por PCR la presencia del transgen *UAS-dcr2* utilizando oligonucleótidos que amplificaran sólo el *dcr2* proveniente del transgen y no el endógeno de la mosca, dado que el oligonucleótido *Forward* hibrida con la secuencia *UAS* por lo que combinándolo con el oligonucleótido *Reverse* sólo se levanta la secuencia del transgen:

Forward: 5' CGTCTACGGAGCGACAAT 3'

Reverse: 5' GTCTATGATGACAACGCTCAGG 3'

3.1.1. *Extracción de ADN genómico de una cabeza*

Para simplificar el análisis de la presencia de transgenes en líneas potencialmente recombinantes se extrajo ADN genómico de la cabeza de un solo individuo con un método rápido y sencillo que permite obtener ADN en cantidades suficientes para realizar una reacción de PCR estándar. Se procesó una cabeza de mosca en 10 μ l de buffer de extracción (Tris 10 mM, NaCl 25 mM y EDTA 1mM) con una concentración final de 200 μ g/ml de proteinasa K; el tejido se trituró con la punta de un tip de 20 μ l. Se incubó 30 minutos a 37 °C. Se tomaron 2 μ l de dicha muestra y se realizó una PCR a tiempo final en condiciones estándar (1 mM $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTPs, 0,2 μ M de oligonucleótidos, buffer de PCR 1X de Invitrogen y Taq Polimerasa de Invitrogen en un volumen final de 20 μ l).

3.2. Análisis de los niveles de expresión génica por qRT-PCR

3.2.1. Extracción de ARN de cabeza de moscas

Para la preparación de ARNm se utilizó el reactivo TRIzol (*Invitrogen*), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Se partió de 35 cabezas de moscas adultas, se utilizaron 600 μ l de *TRIzol* y se resuspendió el ARN purificado en 20 μ l de H₂O calidad ARN (Water –*Molecular Laboratory Reagent* - *SIGMA*). Para confirmar la calidad de la preparación se corrieron geles de agarosa analíticos (al 1%) de modo de observar las bandas características de los ARN ribosomales de *Drosophila*. La cuantificación de las muestras se realizó mediante el *NanoDrop* (*Thermo*), midiendo a 230, 260 y 280nm. Para determinar la calidad de ARN obtenido se utilizaron las relaciones 260/280 y 260/230, considerándose aceptables en el rango de 1,6 a 2,0 para la primera relación y de 0,5 a 1,2 para la segunda.

3.2.2. Reacción de retrotranscripción

Partiendo de 1.5 μ g de ARN total, de los cuales se eliminaron las trazas de ADN mediante la digestión con DNasa I (*Invitrogen*), se procedió a realizar la reacción de retrotranscripción utilizando oligonucleótidos oligo-(dT)₁₂₋₁₈ (*Invitrogen*), oligonucleótidos específicos para cada gen (GSP, en inglés *gene specific primer*) y la enzima *SuperScript III Reverse Transcriptase* (*Invitrogen*), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.2.3. PCR en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR)

Las reacciones de PCR realizadas para evaluar la abundancia relativa de ARNm se llevaron a cabo en el equipo *Mx3005P* (Stratagene). Se utilizó el kit *FastStart Universal SYBR Green Master* (ROX) de Roche. Las reacciones se realizaron en 20 µl finales, utilizando *SYBRGreen* como intercalante y ROX como fluoróforo de referencia. La puesta a punto de las reacciones se realizó de modo de obtener eficiencias de amplificación de $100 \pm 10\%$. Se generaron curvas de calibración con 7 puntos (diluciones seriadas de 1:4, partiendo de una dilución al tercio del ADNc original; la dilución final es 1:6144) (ADN copia); como templado para las curvas de calibración se empleó una mezcla de todas las muestras. Se realizaron duplicados técnicos para todos los puntos de la curva de calibración y para cada muestra biológica a medir. A partir del valor C_t y las curvas de calibración se calculó el número de copias de ADNc para cada uno de los genes de interés y para el gen normalizador en cada muestra a través del método de Pfaffl (Pfaffl, 2001). El gen normalizador utilizado fue *rpl49* para todos los casos.

Amplicón	Oligonucleótidos
<i>per</i>	Forward: 5' GACCGAATCCCTGCTCAATAA 3' Reverse: 5' GGACTTCTTGCTCTTCTCACC 3'
<i>tim</i>	Forward: 5' GGTAACGGATCGCACTTCTCG 3' Reverse: 5' AAGAGACATTGTGCGCTGTTTAAT 3'
<i>clk</i>	Forward: 5' CAGAGTCAGTTGCAGGATCAA 3' Reverse: 5' GCAGATATGTGTAGCGGGATAG 3'
<i>cyc</i>	Forward: 5' TGGACAATCACCCGAACATAC 3' Reverse: 5' CTGAGGCAGGAAACCAATCA 3'
<i>pdf</i>	Forward: 5' GCCACTCTCTGTCGCTATCC 3' Reverse: 5' CAGTGGTGGGTCGTCCTAAT 3'
<i>rpl49</i>	Forward: 5' GAACAAGAAGGCCCATCGTA 3' Reverse: 5' AGTAACAGGCTTRGGCTTGC 3'

Tabla 3: Oligonucleótidos utilizados para las reacciones de qRT-PCR. En todas las reacciones se utilizó una temperatura de annealing de 60 °C.

4. Inmunohistoquímica y análisis de imágenes

4.1. Inmunohistoquímicas en cerebros de moscas adultas

Se decapitaron bajo lupa machos adultos con pinzas de disección y se colocaron las cabezas en solución de fijación (paraformaldehído 4% en solución de PB 0,1 M) durante 30-40 minutos a temperatura ambiente. Luego de la fijación se enjuagaron las cabezas en PT (PBS 0,1 % Tritón X-100) y se disectaron los cerebros en PT con pinzas nº 5 (*Dumont*) bajo una lupa *Leica S6E* (amplificación 80-100X). Se lavaron los restos de fijador con PT, 4 veces durante un periodo de 30 minutos. Luego, se bloquearon los cerebros por 45 minutos con suero de cabra 7% en PT y luego se incubó a 4 °C con el anticuerpo primario hasta la mañana siguiente (*overnight*). Al otro día se removió el anticuerpo primario, se lavó con agitación 4 veces con PT por un periodo de 2 horas y se incubaron los cerebros con el anticuerpo secundario por 2 horas a temperatura ambiente en con agitación. A partir del momento en que los cerebros estuvieron en contacto con el anticuerpo secundario los tubos fueron tapados con aluminio ya que el fluoróforo es fotosensible. Los lavados del secundario se hicieron de la misma manera que con el primario, pero protegidos por el papel aluminio. Los cerebros fueron montados en portaobjetos (*Fisher*) en 5 µl de en una solución de glicerol que preserva la fluorescencia (*VECTASHIELD, Antifade Mounting Medium, H-1000*) y se cubrieron con cubreobjetos (*Marienfeld GmbH*) hasta el momento de su visualización en el microscopio. Los cubreobjetos se sellaron con esmalte de uñas para evitar la desecación de las muestras.

4.1.1. Anticuerpos utilizados

4.1.2. Anticuerpos primarios

Anticuerpo	Especie	Dilución	Procedencia	#Catálogo
Anti-GFP	Conejo	1:500	Invitrogen, USA.	A6455
Anti-GFP	Pollo	1:500	Aves Labs, USA.	GFP-1010
Anti-DsRed	Conejo	1:500	Clontech, USA.	632496
Anti-PDF	Rata	1:500	Generado en el laboratorio.	-

Tabla 4: Anticuerpos primarios utilizados. “Especie” se refiere a la especie animal en la que fue generado el anticuerpo. Todos los anticuerpos son policlonales.

4.1.3. Anticuerpos secundarios

Todos los anticuerpos secundarios utilizados provienen de *Jackson ImmunoResearch* (USA). Se utilizaron en una dilución de 1:250 en PT y se incubaron durante 2 hs a temperatura ambiente.

- Contra conejo: *Cy2-conjugated donkey anti-rabbit, Cy3-conjugated AffiniPure donkey anti-rabbit*
- Contra pollo: *Cy3-conjugated AffiniPure donkey anti-chicken*
- Contra rata: *Alexa Fluor 647-conjugated AffiniPure donkey anti-rat*

4.2. Microscopía y procesamiento de imágenes

Todas las imágenes fueron adquiridas con microscopios confocales Zeiss (Carl Zeiss, Thornwood, NJ) y, en particular, se usaron los microscopios Meta 510 y Meta 710. Las fotos de las proyecciones dorsales se tomaron con un aumento de 40X y 2 de zoom digital. Se realizaron secciones de confocal en el eje Z para registrar la señal de inmunofluorescencia de todo el cerebro o sólo de las proyecciones dorsales de las neuronas PDF. Luego, se realizaron proyecciones en el eje Z para obtener una imagen bidimensional que luego se exportó como JPEG desde el software *Image J* (descargado de <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Para los experimentos en donde se compararon niveles de inmunoreactividad se tomaron todas las fotos en las mismas condiciones de excitación del láser, y ganancia y offset del detector. Solo se cambiaron dichas condiciones entre experimentos independientes y en los casos en los que fue necesario para poder obtener una buena señal detectable y que a la vez no saturara. En esos casos se realizaron luego normalizaciones de la señal (respecto al promedio de señal para todas las muestras de ese experimento) para poder comparar entre experimentos independientes.

Las cuantificaciones de intensidad se realizaron utilizando el programa *Image J*. Para el armado de figuras con múltiples paneles se utilizó el programa *Adobe Illustrator* (*Adobe Systems Incorporated, línea CS*).

4.3. Análisis de niveles de PDF en la proyección dorsal y en los somas

Los niveles de PDF en las terminales dorsales fueron analizados en distintos genotipos y en al menos dos momentos del día (CT2 y CT14). Para su análisis se realizó inmunohistoquímica anti-PDF y anti-GFP como se indicó previamente en animales que sobreexpresaban CD8GFP (marcador de membrana plasmática) en su circuito PDF, ó anti-DsRed en animales que expresaban *pdfRed*. Se tomaron secciones en el confocal de un hemisferio cerebral enfocadas en las terminales dorsales utilizando las mismas condiciones de excitación y ganancia del láser. Utilizando el programa *Image J* se realizó una proyección en Z utilizando la intensidad máxima. Se delimitó el área que contiene las proyecciones de las neuronas PDF más allá del nodo de ramificación de las proyecciones dorsales, utilizando para esto la marca de membrana provista por la proteína CD8GFP ó *pdfRed*. Este proceso se realizó pasando la señal de GFP o DsRed a 8-bits, ajustando dicha señal a un umbral determinado y luego generando una selección con dicho umbral. Dicha selección se aplicó sobre la señal de PDF y se midió la intensidad media del neuropéptido. Para sustraer el ruido (*background*) se restó la intensidad media medida en un rectángulo ubicado fuera de las proyecciones y con un área igual o mayor que la de la señal del circuito analizada. Se promedió la señal de PDF entre cerebros de un mismo tratamiento dentro de un experimento y se consideró cada experimento independiente como un N=1.

4.4. Análisis de complejidad del circuito PDF: cruces totales y largo de las terminales

Para cuantificar la complejidad del árbol axonal de las neuronas sLNv en el protocerebro dorsal se utilizó el método de Sholl modificado (Fernandez et al., 2008; Sholl, 1953). Se realizó inmunohistoquímica contra GFP de moscas que expresaban CD8GFP en las neuronas PDF, o contra el DsRed de moscas que expresaban *pdfRed*, se tomaron secciones de confocal de las terminales axonales dorsales y se realizó la proyección en Z como se detalló previamente. En estas imágenes bidimensionales de las terminales se superpuso un arreglo de 6 anillos concéntricos separados por 10 μm entre sí tomando como centro de los anillos el punto de primera ramificación dorsal que se abre hacia el asta

lateral (Figura 9 A). Se contaron a ciegas (sin conocer el tratamiento del cerebro analizado) los entrecruzamientos entre la terminal axonal y cada anillo concéntrico y se sumaron todos los entrecruzamientos para obtener el número de cruces totales (un indicador de la complejidad del árbol axonal).

Para todas las mediciones estructurales se analizó un único hemisferio por cada cerebro y luego se consideró el promedio de cerebros de una condición dada para cada experimento independiente.

5. Análisis estadístico

El análisis estadístico de todos los experimentos de esta tesis se realizó con el programa *Infostat* versión 2009 (*Grupo InfoStat*, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

Para todos los experimentos los individuos estudiados fueron seleccionados al azar de una población mayor (vial con la progenie del cruzamiento). La adjudicación de los tratamientos fue aleatorio en los casos que resultó posible (el genotipo es un tratamiento que no puede ser adjudicado al azar, pero la determinación de cuales animales fueron disectados a cada CT o fueron inducidos con RU fue aleatorio). En cada cruzamiento las moscas provinieron de los mismos parentales y estuvieron en las mismas condiciones de cría por lo que no se consideraron completamente independientes. Por eso mismo, en todos los experimentos las mediciones en moscas de un mismo cruzamiento se consideraron pseudoréplicas y se utilizaron para estimar mejor la variable a analizar. En ese sentido, la unidad experimental fue en todos los casos la totalidad de la progenie de cada cruzamiento. En los experimentos de actividad locomotora se analizaron más moscas por condición y experimento por lo que en varios casos la muestra analizada provino de más de un cruzamiento. En todos los experimentos se descartaron valores “*outliers*” que se desviaban más de 2 veces de la media.

En todos los análisis, grupos experimentales con letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, con un $p < 0.05$. Para los análisis por PCR cuantitativa se realizaron tests t de Student para la validación de las líneas utilizadas, y para el estudio de las oscilaciones de los genes reloj en

distintas condiciones se realizaron ANOVA de una vía, seguidos de un *Tukey's post-hoc test*. Los análisis de plasticidad estructural se realizaron con ANOVA de dos vías, seguidos de *Tukey's post-hoc test*. Finalmente, los niveles de PDF fueron analizados por Kruskal-Wallis ANOVA de una vía, seguidos de *Conover's post-hoc test*. El número de animales o cerebros en cada experimento se refiere con una letra "n", y el número de experimentos se refiere con una letra "N", el cual fue utilizado para el análisis estadístico.

Resultados

Capítulo I: Los relojes que regulan el fenómeno de plasticidad estructural

1. El reloj de las sLNvs es necesario para la remodelación estructural circadiana

Inicialmente se había reportado que el fenómeno de plasticidad estructural de las terminales neuronales de las sLNvs depende de un reloj funcional (Fernandez et al., 2008). Sin embargo, aún no se conoce en detalle cómo es que el reloj regula tan rigurosamente este fenómeno. Es por ello que nos preguntamos si esta remodelación diaria depende exclusivamente del reloj molecular de las propias sLNvs, o si otros relojes están involucrados en regular dicho *output* del marcapasos central. A través de la utilización de diferentes herramientas que nos permitieron afectar el funcionamiento del mismo de forma circumscripita espacio-temporalmente, analizamos si la remodelación circadiana de las terminales dorsales se veía afectada y cuáles eran los fenotipos observados. Nos encontramos con resultados muy interesantes, que sugieren una mayor complejidad en la regulación del fenómeno en estudio.

1.1. Herramientas para desregular el reloj molecular de *Drosophila*

Para abordar la posibilidad de una remodelación circadiana de las terminales de las sLNvs que depende exclusivamente de su propio reloj molecular, utilizamos el sistema Gal4/UAS para alterar de forma acotada espacio-temporalmente proteínas que forman parte del oscilador central exclusivamente en las LNvs (bajo el control del promotor del neuropéptido PDF, a través de la línea *pdf-Gal4*). En primer lugar, para evaluar la eficiencia de las diferentes herramientas a utilizar y describir un posible efecto diferencial entre ellas, analizamos los patrones de actividad locomotora de animales en los cuales diferentes genes reloj se desregularon constitutivamente a través de silenciamiento mediado por ARN de interferencia específicos (ARNi) para modular los niveles de *per* y *tim* (elementos negativos del reloj), como también a través de la expresión de una construcción que opera como dominante negativo del dímero CLK/CYC (*cyc^{DN}*) (Tanoue et al., 2004), y de la

sobreexpresión de la versión silvestre de CLK (*clk^{OX}*); CLK y CYC son elementos positivos del reloj. Todas estas moléculas tienen un papel central en la generación de ritmos circadianos, como se explicó en la introducción (Ver Introducción, Figura 3)

Como era de esperar, la mayor parte de la población de individuos control (*pdf-GAL4>UAS-dcr2*) (color naranja) presentó un claro patrón de actividad rítmica, con un incremento de la actividad locomotora alrededor de las transiciones luz/oscuridad (reminiscentes del amanecer y el anochecer en la naturaleza), tanto en presencia de claves medioambientales (en ciclos LD) como en libre curso (DD) (Figura 18 A). En DD esta población tiene un período de alrededor de 24hs y los animales consolidan su pico de actividad durante el día subjetivo (Tabla 5). Por otro lado, la expresión constitutiva de los ARNi para distintos genes reloj exclusivamente en las LNvs afectó notablemente la organización temporal de la actividad locomotora en un 70% de la población analizada (Figura 18 B), lo cual refrenda su jerarquía dentro de la red circadiana. Cabe destacar que en el caso de los ARNi, se testearon dos líneas alternativas para cada gen (*per* y *tim*), seleccionando para futuros experimentos la que resultó más eficiente.

Para validar la eficiencia de las herramientas de silenciamiento utilizadas, se midieron los niveles de ARN mensajero (ARNm) de *per* y *tim* por PCR cuantitativa en tiempo real (*real-time qPCR*) de extractos de ARN total de cabeza del control (*tim-Gal4,dcr2>+*) y de animales expresando cada uno de los ARNis; las muestras fueron obtenidas en el momento del día que coincide con el pico de su nivel endógeno (CT14). Se observaron diferencias significativas en cada caso, con una disminución de alrededor del 30% en comparación a los niveles del control (Figura 18C). Como se mencionó anteriormente, utilizamos un ARNi alternativo para cada gen, para descartar potenciales efectos inespecíficos de la estrategia, los cuales mostraron un efecto similar al ya obtenido (Figura 19). Por lo tanto, ambos ARNis son eficientes para disminuir los niveles endógenos de los transcritos que codifican para las proteínas reloj deseadas y afectan de forma eficiente el patrón de actividad locomotora (*output* del reloj).

Además, se utilizó la herramienta ya caracterizada CYC^{DN} , una variante dominante negativa de *cyc* que bloquea la actividad del dímero CLK/CYC (Tanoue et al., 2004). Como se ha reportado anteriormente, expresar cyc^{DN} en las LNvs provoca una reducción drástica en la ritmicidad comportamental (Figura 18A-B; ver **Tabla 5** para un análisis detallado de los parámetros del análisis comportamental). Por otro lado, se realizó la sobreexpresión de la versión silvestre de CLK, con lo que se intentó “sobre-activar” el funcionamiento del reloj molecular. Esta herramienta no generó un patrón de arritmicidad tan marcado como el resto de los casos, por lo que fue excluída de los siguientes experimentos (ver Anexo, Figura 35 A y B).

Todos estos resultados respaldan la importancia de las LNvs en el control de la actividad comportamental rítmica, ya que desregular diferentes genes reloj de forma *cluster*-específica (sLNvs y ILNvs) impacta de forma significativa en la consolidación de la actividad locomotora rítmica.

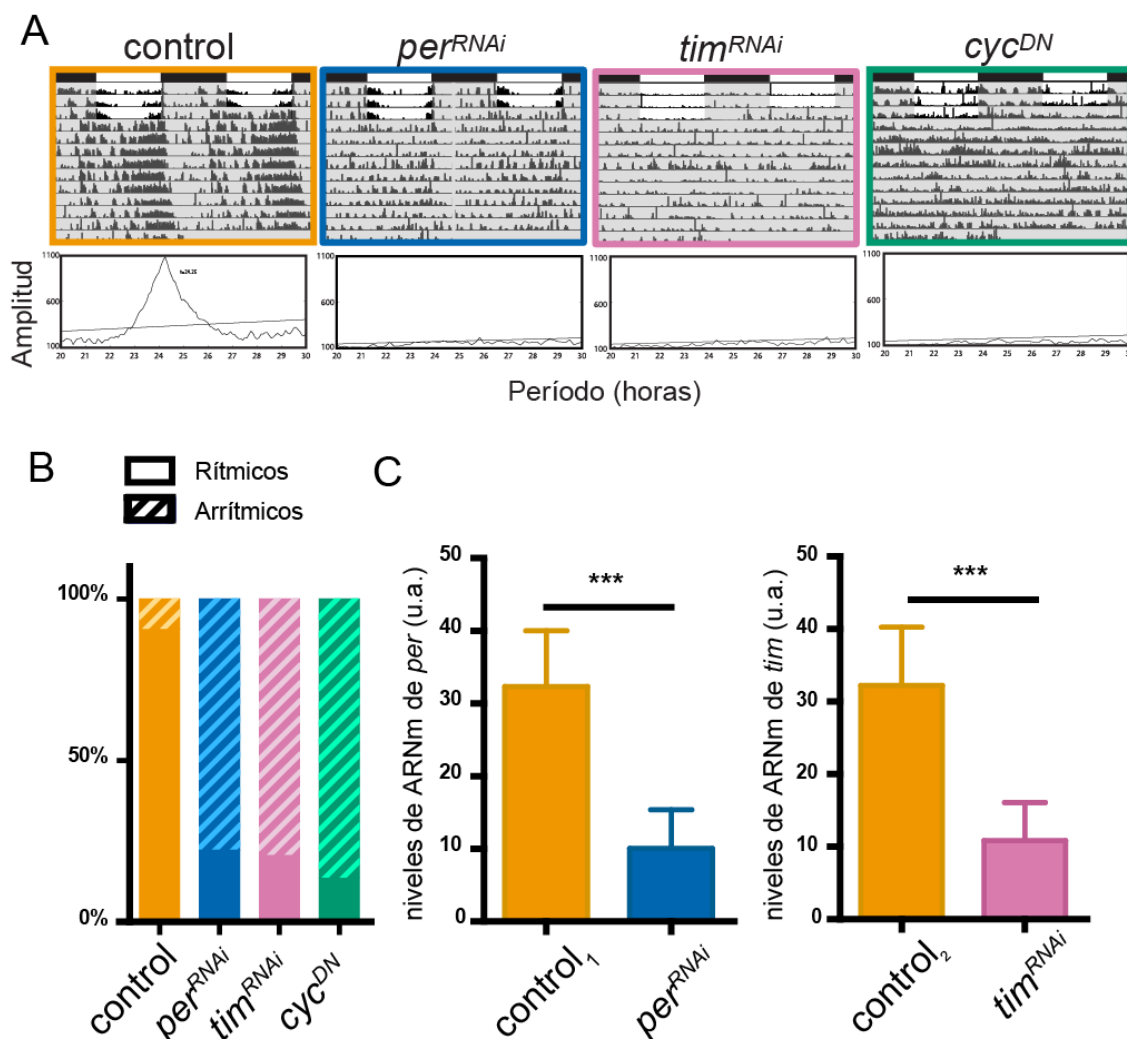


Figura 18: Alterar el reloj de las LNvs resulta en la desconsolidación de la actividad locomotora. A. Actogramas representativos y sus respectivos periodogramas para cada uno de los diferentes genotipos: UAS-*dcr2* (control), UAS-*per*^{ARNi} (#40878), UAS-*tim*^{ARNi} (#29583), and UAS-*cyc*^{DN} bajo el control de *pdf*-Gal4. La actividad locomotora para moscas individuales fue registrada por 4 días en ciclos de 12:12 horas de LD y luego transferidas a DD (área gris) por 9 días adicionales. En los actogramas, las barras blancas representan el día, y las negras, la noche. Para cada actograma correspondiente a un individuo, se muestran sus respectivos periodogramas del *free running* (DD) en la parte inferior. Se muestra el comportamiento rítmico de un macho control (naranja) y cada uno de los genotipos *per*^{ARNi} (en azul), *tim*^{ARNi} (en rosa), y *cyc*^{DN} (en verde). Todas estas manipulaciones resultaron en arritmicidad comportamental. **B.** Porcentaje de ritmicidad. Los datos representan tres experimentos independientes, que incluyeron más de 44 individuos analizados en cada caso. **C.** Validación de la efectividad de los ARNis utilizados. Tanto *per*^{ARNi} como *tim*^{ARNi} fueron expresados bajo el control de *tim*-Gal4. Los niveles fueron normalizados al gen *rpl49*. Los niveles de los transcritos *per* y *tim* fueron reducidos eficazmente en comparación a sus respectivos controles. Un test *t* de Student muestra diferencias significativas entre los niveles de expresión. Tres asteriscos (***) indican diferencias significativas con un $p < 0.001$. Se realizaron tres experimentos independientes, $N=3$.

Genotype	%R±SEM	Tau±SEM	FFT±SEM	Power±SEM	N	n
<i>pdf</i> GAL4>+	90.69±3.44 ^A	24.26±0.4	0.035±0.009	725.37±353.4	3	66
<i>pdf</i> GAL4> <i>per</i> ^{RNAi} I	22.31±9.78 ^B	23.94±0.12	0.023±0.008	247.42±143.71	3	70

<i>pdfGAL4>tim^{RNAi} I</i>	20.72±15.99 ^B	23.50±0.24	0.013±0.003	347.40±126.48	3	61
<i>pdfGAL4>cyc^{DN}</i>	13.73±3.34 ^B	23.67±0.09	0.018±0.004	175.60±53.67	3	46
<i>pdfGAL4>per^{RNAi} II</i>	43.54±13.91 ^{AB}	23.72±0.09	0.024±0.007	336.92±189.72	3	73
<i>pdfGAL4>tim^{RNAi} II</i>	46.26±16.75 ^{AB}	24.33±0.44	0.022±0.007	506.65±155.42	3	78

Tabla 5: Detalle de los parámetros circadianos que describen los patrones de actividad locomotora en animales depletados de la función del reloj en las LNvs. El análisis incluye el período (Tau) y diferentes medidas de la robustez de la ritmicidad, como lo es el FFT, el *power* y el porcentaje de ritmicidad (%R). Se muestra el promedio ± E.E. (error estándar) de los diferentes genotipos en los que se altera el reloj molecular, como asimismo el control. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas con un $p < 0.05$ (ANOVA de una vía, seguido de un *Tukey post-hoc test*). N indica el número de experimentos, el cual fue utilizado para el análisis estadístico. n indica el número de animales testeados. Líneas empleadas: *per^{ARNi} I* (Bloomington Stock Center: #40878) y *tim^{ARNi} I* (Bloomington Stock Center: #29583) son los ARNs utilizados a lo largo del proyecto; las líneas *per^{ARNi} II* (Bloomington Stock Center: #31285) y *tim^{ARNi} II* (VDRG Stock Center: #2886) son los alternativos, por ello se encuentran en gris.

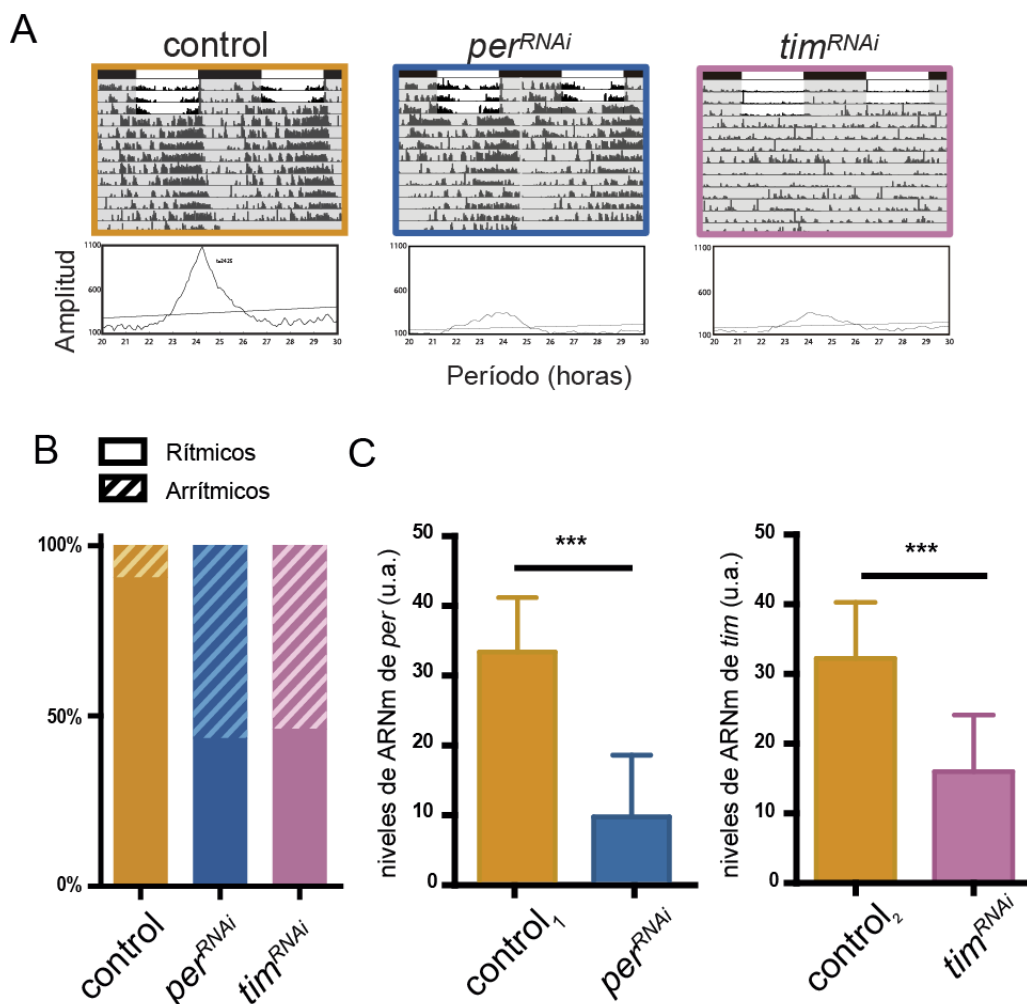


Figura 19: ARNs alternativos son igualmente eficientes para generar fenotipos comportamentales. **A.** Actogramas representativos y sus respectivos periodogramas para los diferentes genotipos: UAS-*dcrl2* (control), UAS- *per^{ARNi}* (#31285) y UAS-*tim^{ARNi}* (#2886) bajo el control de *pdf-Gal4*. La actividad locomotora fue registrada en moscas individuales por 4 días en ciclos de 12:12 horas de LD y luego transferidas a DD (área gris) por 9 días adicionales. En los actogramas, las barras blancas representan el día, y las negras la noche. Cada actograma correspondiente a un individuo representativo se acompaña de su respectivo

periodograma de la fase en DD en el panel inferior. Se muestra el comportamiento rítmico de un macho control (naranja) y cada uno de los genotipos *per*^{ARNi} (en azul) y *tim*^{ARNi} (en rosa). **B.** Porcentaje de ritmicidad. Los datos representan tres experimentos independientes, que incluyen más de 70 individuos analizados en cada caso. **C.** Validación de la efectividad de los ARNis utilizados. Tanto *per*^{ARNi} como *tim*^{ARNi} fueron expresados bajo el control de *tim*-Gal4. Los niveles fueron normalizados al gen *rpl49*. Los niveles de ambos *per* y *tim* son reducidos en comparación a sus respectivos controles. Un test *t* de Student muestra diferencias significativas entre los niveles de expresión. Tres asteriscos (***) indican diferencias significativas con un $p < 0.001$. Se realizaron tres experimentos independientes, N=3.

1.2. *Alterar los niveles de diferentes componentes del reloj altera las oscilaciones moleculares*

El correcto funcionamiento del reloj, y por ende la ritmicidad de sus diversos *outputs*, depende de una regulación precisa del oscilador molecular autónomo de célula. Dado que afectar distintos componentes de este oscilador molecular en las LNvs afecta los patrones comportamentales de una forma diferencial, decidimos medir los distintos niveles de los principales genes que lo conforman como resultado de la desregulación crónica a través de las herramientas descritas anteriormente. Para ello examinamos los niveles de ARN mensajero (ARNm) de *per*, *tim*, *dClk*, y *cyc* en dos momentos del día, CT2 y CT14, en el contexto de cada una de las desregulaciones utilizando la línea pan-circadiana *tim*-Gal4. Para facilitar la visualización de los resultados y la comparación entre los distintos genotipos se muestra la tasa de niveles en el pico/valle para cada uno de los transcritos.

Llamativamente, encontramos que la amplitud de la oscilación de los transcritos tanto de *per* como de *tim*, se redujo significativamente en todas las condiciones experimentales analizadas, independientemente de la proteína reloj alterada (Figura 20 y Figura 21), lo cual es interesante considerando que cumplen funciones opuestas: PER y TIM son reguladores negativos de su propia transcripción, mientras que CYC es parte del complejo responsable de su activa transcripción.

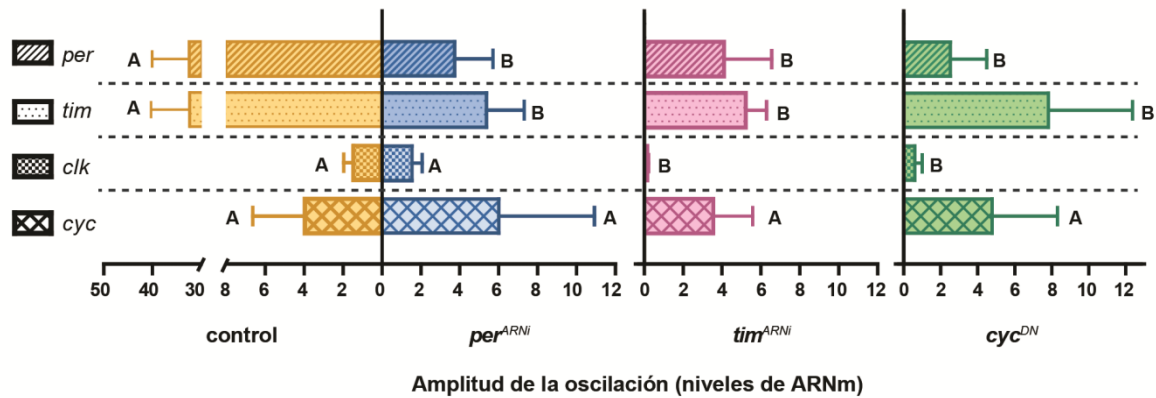


Figura 20: Afectar los niveles de componentes del reloj resulta en oscilaciones moleculares alteradas. Para cada gen, se grafica el coeficiente de los niveles de ARNm altos/bajos (CT14/CT2 para *per*, *tim* y *cyc*; y CT14/CT2 para *clk*). Los niveles fueron normalizados al gen de referencia *rpl49*. Los análisis estadísticos fueron realizados comparando los niveles de cada gen en los distintos genotipos (separados por la línea punteada). Los genotipos analizados son: control (naranja), *per*^{ARNi} (en azul), *tim*^{ARNi} (en rosa), y *cyc*^{DN} (en verde), bajo el promotor *tim*-Gal4. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas con un $p < 0.05$ (ANOVA de una vía, seguido de un *Tukey post-hoc test*). Se realizaron tres experimentos independientes, $N=3$.

Por otro lado, y tal como se esperaba, los niveles de *dClk* son significativamente más bajos que los de *per* y *tim* en el control (Lerner et al., 2015), lo que puede ser una de las causas de la dificultad en detectar la oscilación en los niveles basales de este transcrita, la cual, en estos experimentos reflejó una amplitud de 2 veces. Tanto disminuir los niveles de *tim* como interferir con la función del dímero CLK/CYC impactó significativamente en los niveles de *dClk*, a pesar de que estas proteínas no regulan directamente su expresión sino a través de otros reguladores (PDP1 y VRI) que son targets directos de CLK/CYC. Otro resultado interesante que surgió de estos experimentos es una fluctuación sutil en los niveles de *cyc*, a pesar de que se ha reportado a través de la técnica de Northern Blot que los niveles de *cyc* no oscilan (Rutila et al., 1998). Nuestros experimentos muestran un sutil cambio entre CT2 y CT14 en los niveles endógenos de *cyc* en el control (más altos a CT14 que a CT2), el cual no se ve afectado en ninguno de los genotipos analizados (Figura 21), lo cual sugiere que no está regulado directamente por estos componentes.

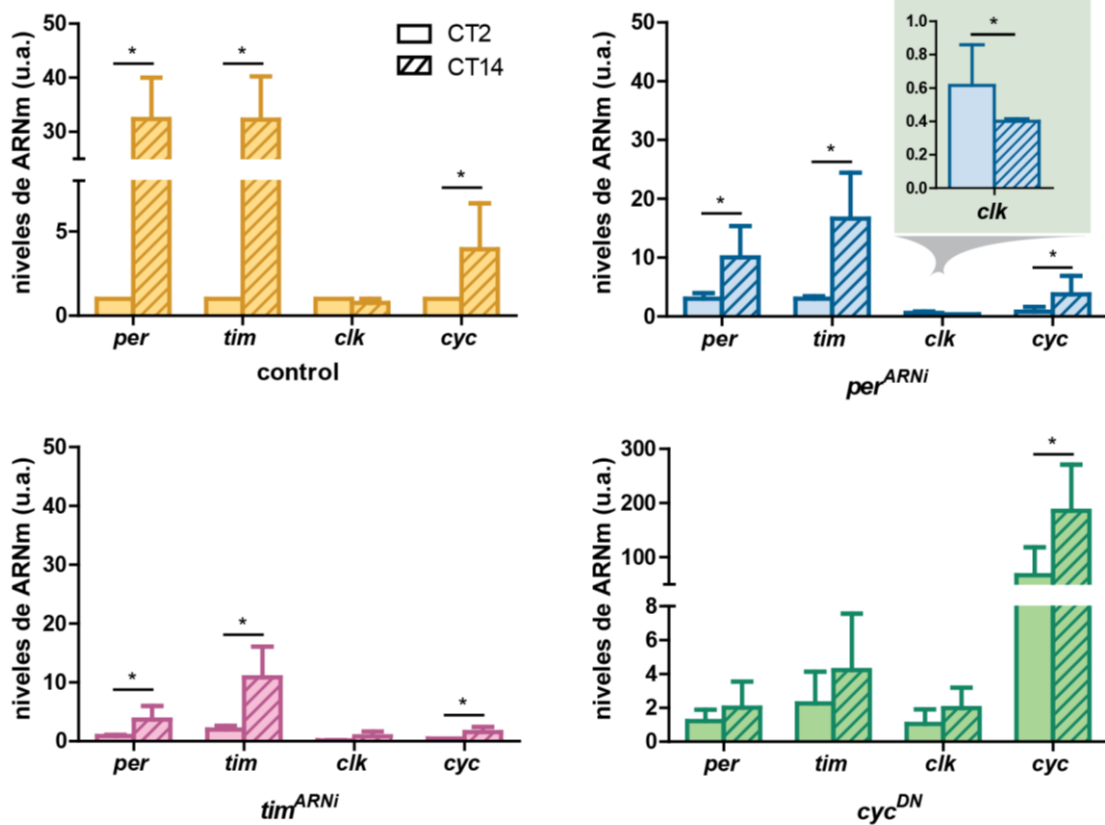


Figura 21: Efecto de la disregulación de diferentes componentes del reloj en sus oscilaciones moleculares. Para cada gen se graficaron los niveles de ARNm a CT2 y CT14. Los niveles fueron normalizados al gen de referencia *rpl49*. Los genotipos analizados son: control (naranja), *per*^{ARNi} (en azul), *tim*^{ARNi} (en rosa), y *cyc*^{DN} (en verde), bajo el promotor *tim*-Gal4. El análisis estadístico se realizó comparando niveles transcripcionales de cada gen en forma individual para cada punto horario, dentro de cada genotipo. Un test *t* de Student muestra diferencias significativas entre los niveles de expresión. El asterisco (*) indica diferencias significativas con un $p < 0.05$. Tres experimentos independientes fueron realizados, $N=3$. Los *primers* utilizados para detectar *cyc* amplifican tanto el endógeno como el de la construcción que porta *cyc*^{DN}, lo cual justifica el incremento de los niveles de ARNm de *cyc* en el genotipo *cyc*^{DN}. Estos datos se emplearon para construir la Figura 20.

En resumen, estos resultados dejan en evidencia que alterar los diferentes componentes del reloj resultan en un reloj aberrante, sin importar cuál de sus componentes fue modificado (es decir, la transcripción mediada por el dímero CLK/CYC, o su propia represión están alterados). Estos experimentos permiten concluir que cualquiera de estas intervenciones genéticas es útil para poner de manifiesto la relevancia de un reloj autónomo de célula en un *output* del reloj en particular, como por ejemplo, el control de la plasticidad estructural de las terminales dorsales de las sLNvs.

1.3. ***La plasticidad estructural circadiana se ve alterada de forma diferencial por los diferentes componentes del reloj molecular***

Hace algunos años, nuestro laboratorio reportó cambios morfológicos en las terminales axonales de las sLNvs a lo largo del día, y mostró que este fenómeno está regulado por el reloj molecular, ya que no se observan cambios en los mutantes *per⁰¹* y *tim⁰¹* (Fernandez et al., 2008). Sin embargo, a pesar de que los cambios circadianos en la complejidad de las terminales de las sLNvs fueron observados en ambos mutantes nulos, la morfología de las terminales era claramente distinta entre ellos, sugiriendo que PER y TIM podrían jugar roles “no-circadianos” adicionales. Para ahondar en esta posibilidad nos propusimos examinar el impacto de alterar los diferentes componentes del reloj molecular exclusivamente en las LNvs sobre la arquitectura de las terminales dorsales de forma específica en el adulto para evitar potenciales efectos en el desarrollo.

Para esto, utilizamos la versión inducible de Gal4 llamada *GeneSwitch* (GS) restringida específicamente a las LNvs (Depetris-Chauvin et al., 2011), combinada con un fluoróforo GFP anclado a membrana (CD8:GFP), para describir la complejidad de las arborizaciones axonales en cada uno de los genotipos *per^{ARNi}*, *tim^{ARNi}*, y *cyc^{DN}* y así estudiar el impacto de interferir con el paso de las oscilaciones moleculares sobre la plasticidad estructural circadiana. Animales que fueron transferidos a comida con RU-486 48 horas luego de su eclosión, fueron disectados a CT2 y CT14 en el tercer día en libre curso (DD3) (Figura 22 A).

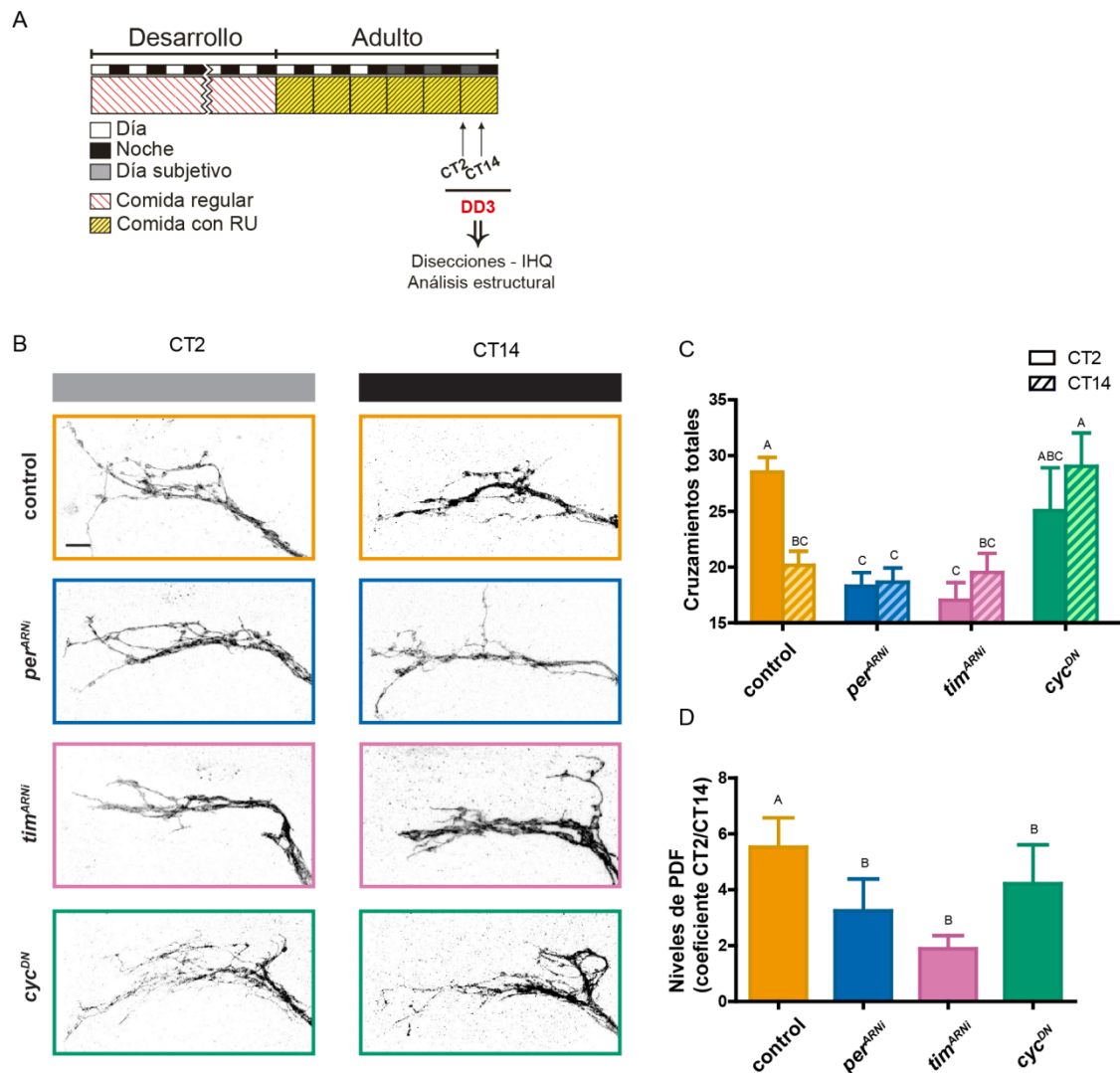


Figura 22: La plasticidad estructural circadiana es alterada diferencialmente por los distintos genes reloj. **A.** Diagrama esquemático que ilustra el protocolo utilizado. RU refiere a la comida que incluye la droga RU-486, mientras que IHQ refiere a la técnica inmunohistoquímica. **B.** Imágenes representativas de microscopía confocal de la señal GFP de membrana en las terminales del protocerebro dorsal, tanto en el día subjetivo (CT2, barra gris) como en la noche subjetiva (CT14, barra negra), durante el tercer día en condiciones constantes (DD3). **C.** Cuantificación de los cruzamientos totales. Los animales control muestran la remodelación circadiana de sus terminales, mientras que en los animales con el reloj afectado no hay cambios a lo largo del día subjetivo. Los datos representan tres experimentos independientes (N=3) y un mínimo de 27 cerebros analizados por CT/genotipo (n=8-10). Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas con un $p < 0.05$ (ANOVA de dos vías, seguido de un *Tukey post-hoc test*). **D.** Cuantificación de la inmunoreactividad de PDF en el protocerebro dorsal a CT2 y CT14 en DD3. Para una comparación más directa, se muestran los niveles como un coeficiente entre CT2 y CT14. En los animales control (naranja), se evidencia cambios en la inmunoreactividad de PDF entre el día y noche subjetivos, mientras que los diferentes genotipos donde se desregula el reloj las diferencias son menores. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas con un $p < 0.05$ (ANOVA de una vía *Kruskal-Wallis*, seguido de un *Conover post-hoc test*, $n=8-10$, $N=3$).

Como ya había sido reportado por nuestro laboratorio, la estructura de las terminales dorsales en el control presenta mayor complejidad por la mañana (CT2) y menor por la noche (CT14) (Figura 22 B y C, en naranja) (Fernandez et al., 2008; Gorostiza et al., 2014). Llamativamente, al afectar los

elementos negativos del reloj molecular, *per* (en azul) y *tim* (en rosa), la complejidad se redujo significativamente en comparación a la observada en el control en la mañana subjetiva (CT2) (Figura 22 B y C), pareciéndose a la estructura observada en un genotipo control por la noche (CT14). Tal como se esperaba al afectar la función del propio reloj, no se observaron diferencias a lo largo del día en ninguno de los dos genotipos.

Por otro lado, la expresión del dominante negativo *cyc*^{DN} (en verde) dio como resultado arborizaciones muy complejas a lo largo del día; de hecho, la arquitectura de estas terminales (al nivel de lo observado por microscopía confocal) es muy diferente a la de los controles en cualquier punto horario; específicamente, observamos un alto número de neuritas (bifurcaciones de las ramas primarias y secundarias), sugiriendo que interrumpir activamente el funcionamiento del dímero CLK/CYC en el adulto dispara efectos morfológicos claros, más allá de los previstos como consecuencia de afectar el reloj molecular endógeno. Coincidentemente, un resultado similar en la estructura de las terminales fue observado al alterar la expresión de CLK (*clk*^{OX}) (Ver Anexo, Figura 35 C).

En paralelo se analizó la inmunoreactividad de PDF en las terminales dorsales de las neuronas sLN_v, la cual se ha demostrado que oscila de forma circadiana tanto en condiciones de luz-oscuridad (LD) como en condiciones constantes (DD) (Park et al., 2000), y se ve interrumpida en mutantes nulos para componentes esenciales del reloj molecular (Park et al., 2000). Para definir si interferir con la función del reloj circadiano del adulto afectaba este otro *output* de las LN_vs se realizó inmunohistoquímica en cerebros enteros disectados en momentos donde PDF tiene su máximo y su mínimo (CT2 y CT14, respectivamente), tanto en controles como en los genotipos que expresaban *per*^{ARNi}, *tim*^{ARNi}, y *cyc*^{DN} de forma adulto-específica. Como se evidencia en la Figura 22 B, la línea control *pdf*-GS>CD8GFP (naranja) muestra diferencias significativas en los niveles de PDF entre la mañana y la noche. Por el contrario, la amplitud de la oscilación en la inmunoreactividad de PDF en las terminales dorsales en cada una de las condiciones experimentales se redujo con respecto al control. Sin embargo, las diferencias más pronunciadas se

observaron en los genotipos con niveles disminuidos de *per* (*per^{ARNi}*, azul) o de *tim* (*tim^{ARNi}*, rosa) comparándolos con *cyc^{DN}* (verde).

En resumen, estos experimentos demuestran que la remodelación circadiana de las terminales de las sLNvs está dirigida por el reloj molecular de las propias LNvs. Aún más, alterar tanto los elementos positivos como negativos de dicho reloj molecular afectan el proceso de remodelación diferencialmente, de modo de dar como resultado estructuras diferentes. Asimismo, y bajo estas condiciones, no solo la plasticidad circadiana sino también los niveles de PDF se ven afectados, indicando que ambos *outputs* dependen del correcto funcionamiento del oscilador de las propias LNvs.

2. El reloj de la glia contribuye a la regulación de la plasticidad estructural circadiana de las terminales dorsales de las sLNvs

Una vez demostrado que el reloj de las propias LNvs es necesario para que ocurra el fenómeno de plasticidad estructural circadiana de dichas terminales, nos preguntamos si relojes adicionales contribuyen a este fenómeno. Un candidato evidente son las células gliales, las cuales juegan un papel en la actividad locomotora rítmica (Ng et al., 2011); además, está bien establecido que los astrocitos modulan la actividad de diferentes subtipos neuronales, reforzando esta hipótesis. Para ello, se utilizaron moscas que expresaban el dominante negativo *cyc^{DN}*, en nuestras manos la herramienta más efectiva para alterar el correcto funcionamiento del reloj (Figura 18 y Figura 20), para interrumpir el reloj de la glia de forma aguda, y adulto-específica empleando la versión inducible de Gal4 por temperatura (McGuire et al., 2004), y el *driver* específico pan-glial *repo*.

A temperatura restrictiva (23°C, Figura 23 A), donde no hay expresión del dominante negativo *cyc^{DN}*, animales *repo-Gal4;tub-Gal80^{TS}>cyc^{DN}* exhiben la esperada remodelación de sus terminales dorsales, más arborizadas durante el día subjetivo que durante la noche (Figura 23 B y C). En contraposición, interrumpir el funcionamiento del reloj en la glia provocó la ausencia de remodelación, resultando en terminales poco ramificadas similares a las

observadas por la noche (CT14) en un control (Figura 23 B y C). Los controles mantenidos en temperatura permisiva (30°C) mantienen la remodelación circadiana de las terminales dorsales (Figura 24). Estas observaciones afianzan la noción de una participación activa del reloj de la glia regulando *outputs* del reloj circadiano, y más específicamente, que son esenciales para que ocurra la plasticidad estructural circadiana.

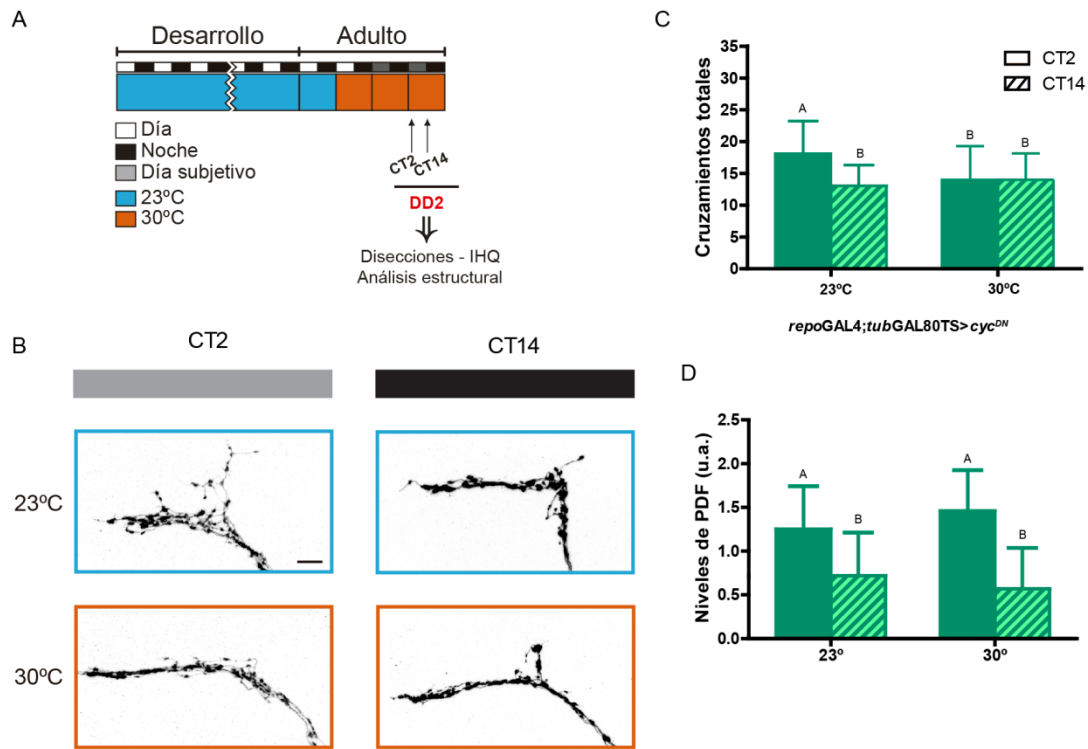


Figura 23: Los relojes de la glia participan del fenómeno de remodelación estructural circadiana de las sLNvs. **A.** Diagrama esquemático que ilustra el protocolo utilizado; la condición restrictiva está en celeste (23°C) y la permisiva en naranja (30°C). **B.** Imágenes representativas de microscopía confocal, del DsRed en las terminales dorsales en animales que contienen un UAS-*cyc*^{DN}, bajo el control de *repo*-Gal4;*tub*-Gal80^{TS}. *pdf*RED permite la visualización de las terminales axonales. Los cerebros fueron disectados al inicio de la mañana subjetiva (CT2, barra gris) y al principio de la noche subjetiva (CT14, barra negra), durante el segundo día de condiciones constantes (DD2), el cual corresponde al tercer día de condición permisiva (30°C). Animales control (siempre mantenidos a 23°C) muestran una remodelación estructural circadiana de las terminales dorsales, mientras que los animales inducidos a 30°C no muestran diferencias a lo largo del día, y su complejidad se asemeja a la de la noche en el control. Los datos representan el promedio de tres experimentos individuales (N=3) y un mínimo de 27 cerebros fueron analizados por CT/genotipo (n=8-10). Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas con un $p < 0.05$ (ANOVA de dos vías, seguido de un Tukey post-hoc test). **D.** Cuantificación de la inmunoreactividad de PDF en el protocerebro dorsal de cerebros disectados a CT2 y CT14 en DD3. Las moscas control (23°C), muestran una clara oscilación de los niveles de PDF; y aquellas que expresan *cyc*^{DN} a 30°C no fueron significativamente distintas del control. Las mismas letras indican que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$) (ANOVA de una vía Kruskal Wallis, seguido de un Conover post-hoc test, n=8-10, N=2).

También analizamos la inmunoreactividad de PDF en las terminales dorsales, dada su establecida relevancia para esta forma de plasticidad

(Depetris-Chauvin et al., 2014). Sorprendentemente, encontramos que los niveles de PDF siguen oscilando entre el día y noche subjetivos cuando el reloj en la glia está afectado; de hecho, bajo estas condiciones los niveles de PDF no son distintos al control (Figura 23 D), aportando más evidencia de que estos dos *outputs* del reloj (niveles de PDF y plasticidad estructural) pueden ser desacoplados (Depetris-Chauvin et al., 2011).

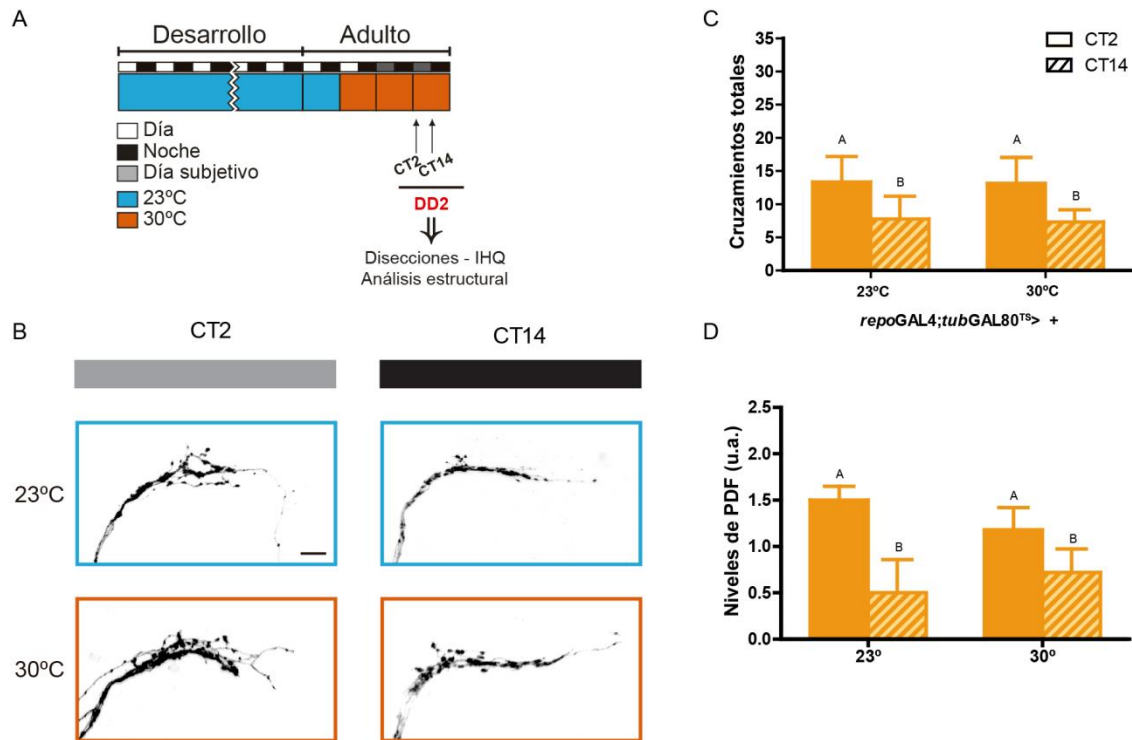


Figura 24: La plasticidad estructural no se ve afectada por la temperatura. **A.** Diagrama esquemático que ilustra el protocolo utilizado; la condición restrictiva está en celeste (23°C) y la permisiva en naranja (30°C). **B.** Imágenes representativas de microscopía confocal, del DsRed en las terminales dorsales en animales control *repo-Gal4; tub-Gal80^{TS}; pdfRED>+* disectados al inicio de la mañana subjetiva (CT2, barra gris) y al principio de la noche subjetiva (CT14, barra negra), durante el segundo día de condiciones constantes (DD2), el cual corresponde al tercer día de condición permisiva (30°C). Animales control (siempre mantenidos a 23°C) muestran una remodelación estructural circadiana de las terminales dorsales (indicados en celeste). **C.** Cuantificación de los cruzamientos totales de *repo-Gal4; tub-Gal80^{TS}; pdfRED>+*. Moscas control (23°C) muestran una remodelación estructural circadiana, como así también los animales a 30°C. Los datos representan un experimento, donde 10 cerebros por CT/genotipo fueron analizados. Letras diferentes indican diferencias significativas con un $p < 0.05$ (ANOVA de dos vías, seguido de un *Tukey post-hoc test*). **D.** Cuantificación de los niveles de PDF en el protocerebro dorsal a CT2 y CT14 en DD3. Animales control (23°C), exhiben oscilaciones circadianas de PDF, mientras que animales a 30°C no son significativamente distintos del control. Mismas letras indican que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$) (ANOVA de una vía *Kruskal-Wallis*, seguido de un *Conover post-hoc test*). Los resultados representan un solo experimento, donde 10 cerebros por CT/genotipo fueron analizados.

Todos estos resultados indican que la plasticidad estructural circadiana de las terminales dorsales de las sLNvs depende no solo de su propio reloj molecular, sino también de relojes en la glia que contribuyen a esta forma de

plasticidad. Esto no resulta sorprendente dada la basta evidencia de la participación de la glia en regular neuronales, como la transmisión sináptica o la plasticidad (Brown and Neher, 2014; Clarke and Barres, 2013; Stork et al., 2012). Nuestros resultados aportan evidencia que la comunicación entre la glia y las neuronas participa activamente en la regulación de la remodelación circadiana, aunque los mecanismos a través de los cuales esto ocurre aún no han sido explorados en detalle (Gorska-Andrzejak, 2013).

Capítulo II: El rol del neuropéptido PDF

Las LNvs son las únicas neuronas dentro de las 150 que forman parte de la red circadiana de *Drosophila* que expresan el neuropéptido PDF (*Pigment dispersing factor*). Se ha reportado que la expresión de éste dentro de las terminales de las sLNvs cambia a lo largo del día, con niveles más altos durante el día, y más bajos durante la noche (Park et al., 2000). PDF tiene un rol fundamental en el correcto funcionamiento del reloj circadiano de *Drosophila* (Lin et al., 2004; Yoshii et al., 2009c), y asimismo está íntimamente relacionado con otro *output* del reloj, el fenómeno de plasticidad estructural ya descrito (Depetris-Chauvin et al., 2014).

Es por esto que en esta segunda etapa del proyecto de investigación, nos propusimos ahondar en los mecanismos de acción de PDF para así lograr describir cuál es su rol en la plasticidad estructural circadiana, como el reloj regula estos dos *outputs* tan relacionados, y cómo ambos se relacionan entre sí.

1. Conectividad entre los dos *clusters* PDF⁺

El neuropéptido PDF es liberado tanto por las sLNvs como las ILNvs, que tienen proyecciones estereotípicas hacia distintas regiones del cerebro: el protocerebro dorsal ipsilateral (sLNvs) y el lóbulo óptico ipsi y contralateral (ILNvs), respectivamente (Helfrich Forster 1997). En el caso de las ILNvs, las proyecciones contralaterales atraviesan la médula accesoria, donde reside el compartimiento somatodentrítico de las sLNvs, lo cual abre la posibilidad de que ambos grupos neuronales podrían contactarse. Hasta el momento se desconoce si la liberación de las vesículas PDF ocurre a lo largo de los tractos fasciculados o exclusivamente en las terminales. Para estudiar el origen de las moléculas de PDF que afectan específicamente al fenómeno de plasticidad estructural se plantearon experimentos para poder evaluar la fuente del neuropéptido, es decir, si la remodelación depende de PDF liberado por las propias sLNvs en el protocerebro dorsal, o si por el contrario, del liberado por las ILNvs en la médula accesoria. Para ello, se combinaron los elementos necesarios para analizar el fenómeno de remodelación en un contexto genético

que permite expresar de forma adulto-específica (*Gal4; tub-Gal80^{TS}*) los ARNis dirigidos contra *pdf* o su receptor *pdfR*, para así disminuir los niveles de estos transcriptos exclusivamente en el adulto (en uno u otro grupo neuronal). Para ello se emplearon dos líneas *Gal4*, una específica para las sLNvs (a la cual llamaremos sLNvs-*Gal4*, donada generosamente por el Dr. Taishi Yoshii, de la Universidad de Okayama, Japón) y otra específica para las ILNvs (*c929-Gal4*, (Taghert et al., 2001)).

En primer lugar, y para validar la efectividad de la manipulación a analizar, se evaluó la inmunoreactividad de PDF en las terminales dorsales. Como ya se ha mencionado, los niveles del neuropéptido oscilan en animales control, alcanzando niveles máximos por la mañana (CT2). Las fluctuaciones de niveles de PDF se observan en ambas líneas control (Figura 25 A y B, en rojo). Por el contrario, los animales que expresan el ARNi para *pdf* específicamente en las sLNvs, presentan niveles reducidos del neuropéptido respecto al control en los dos puntos analizados, indicando que la herramienta utilizada es eficiente en estas condiciones experimentales (Figura 25 A, en violeta). Curiosamente, al afectar los niveles del receptor *pdfR* en estas mismas neuronas, se ven afectados los niveles del neuropéptido en las terminales dorsales, particularmente por la mañana subjetiva, indicando que la vía de señalización de PDF/PDFR podría estar involucrada en la regulación de los niveles de PDF en las terminales (Figura 25 A).

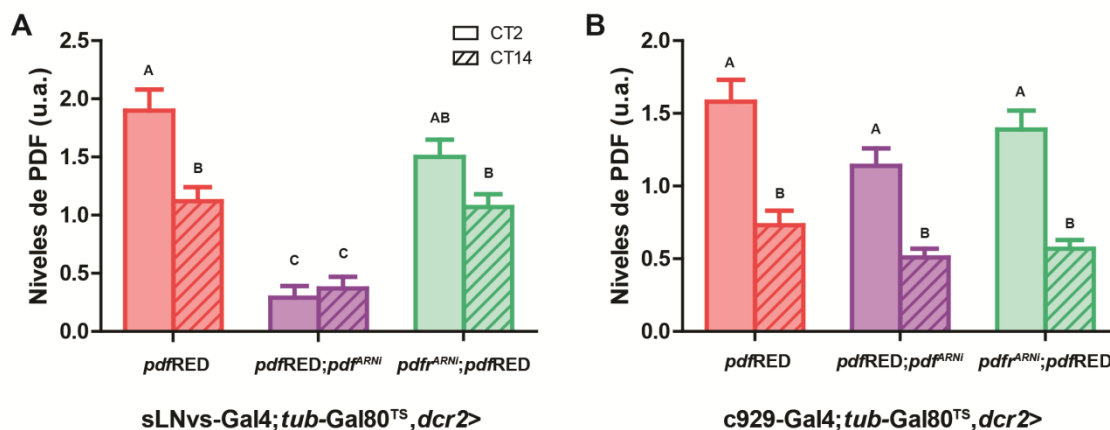


Figura 25: Afectar tanto PDF como su receptor PDFR en las sLNvs provoca la pérdida de la oscilación en los niveles de neuropéptido. Los cerebros fueron disectados al inicio de la mañana subjetiva (CT2) y al principio de la noche subjetiva (CT14), durante el sexto día de condiciones constantes (DD6), el cual coincide con el sexto día de inducción (30°C, inducción crónica). **A.** Animales bajo el control

de sLNvs-Gal4;*tub-Gal80^{TS}*, *dcrl2*. El control (*pdfRED*, rojo), exhibe oscilaciones circadianas en los niveles de PDF, mientras que animales que expresan *pdf^{ARNi}* (violeta) y *pdf^{ARNi}* (verde) pierden dicha oscilación. La expresión de *pdf^{ARNi}* afecta sutilmente los niveles de PDF en las terminales, particularmente por la mañana subjetiva. **B.** Animales bajo el control de *c929-Gal4;tub-Gal80^{TS}*, *dcrl2*. El control (*pdfRED*, rojo), exhibe oscilaciones circadianas de PDF; los animales que expresan *pdf^{ARNi}* (violeta) y *pdf^{ARNi}* (verde) no son significativamente distintos del control. Las mismas letras indican que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$) (ANOVA de una vía *Kruskal-Wallis*, seguido de un *Conover post-hoc test*). Los resultados representan dos experimentos independientes, donde se analizaron 7-10 cerebros por CT/genotipo (N=2, n=7-10).

Al analizar los niveles de PDF en los animales que fueron afectados exclusivamente en las ILNvs (Figura 25 B), no se observaron cambios en la oscilación de la inmunoreactividad en las terminales dorsales de las sLNvs, a pesar de que se evidencia un sutil efecto (la disminución de la amplitud de la oscilación) en el caso de los animales que expresan el ARNi para *pdf*.

A continuación, se evaluó la complejidad de las terminales dorsales de las sLNvs en cada uno de los contextos genéticos descritos, para identificar el origen de la señal de PDF que afecta específicamente al fenómeno de plasticidad estructural. Cuando se redujeron los niveles de PDF en las sLNvs (por expresión del *pdf^{ARNi}*), se observó la pérdida de la remodelación estructural circadiana, pero, contrariamente a lo esperado, las terminales mostraron mucha complejidad en ambos momentos analizados, asemejándose a la mañana de un control (CT2) (Figura 26 A); estos resultados contrastan con los reportados anteriormente por el laboratorio (Gorostiza et al., 2014), en los cuales la expresión del *pdf^{ARNi}* en ambos grupos neuronales (una condición similar a un mutante nulo restringido a estadios adultos) correlaciona con terminales poco arborizadas a lo largo de todo el día. Una posibilidad a explorar es que la diferencia radique en que en los experimentos realizados en esta tesis coexisten un grupo con niveles normales de PDF junto a otro afectado; esta posibilidad será contrastada combinando las dos líneas Gal4 descritas anteriormente.

Afectar los niveles del receptor *pdfR* exclusivamente en las sLNvs no solo altera sutilmente los niveles de PDF sino que también afecta la plasticidad estructural. Estos resultados sugieren que la disminución en la vía de señalización de PDF –asociada a la reducción de los niveles de neuropéptido en las terminales específicamente por la mañana– redundaría en una mayor complejidad de la estructura (Figura 26 A).

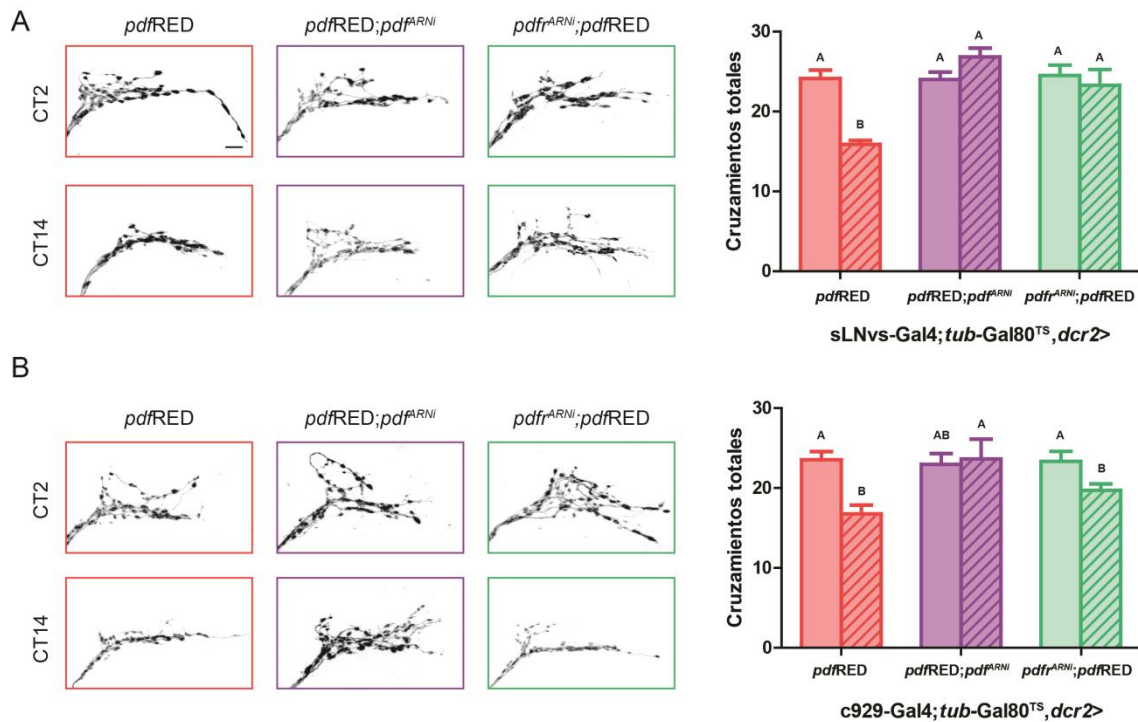


Figura 26: La plasticidad estructural circadiana depende de PDF liberado tanto por las sLNvs como las ILNvs. Los cerebros fueron disectados al inicio de la mañana subjetiva (CT2) y al principio de la noche subjetiva (CT14), durante el sexto día de condiciones constantes (DD6), el cual coincide con el sexto día de inducción (30°C, inducción crónica). **A.** Izquierda: Imágenes representativas de microscopía confocal, del DsRed en las terminales del protocerebro dorsal de animales bajo el control de *sLNvs-Gal4;tub-Gal80^{TS}, dcr2*. Derecha: Cuantificación de los cruzamientos totales. Animales control muestran la remodelación circadiana de sus terminales, mientras que animales con *pdf^{ARNi}* y *pdf^{ARNi};pdfRED*, no muestran cambios a lo largo del día. **B.** Izquierda: Imágenes representativas de microscopía confocal, del DsRed en las terminales del protocerebro dorsal de animales bajo el control de *c929-Gal4;tub-Gal80^{TS}, dcr2*. Derecha: Cuantificación de los cruzamientos totales. El control (*pdfRED*, rojo), exhibe remodelación estructural circadiana de sus terminales, mientras que animales que expresan *pdf^{ARNi}* (violeta) pierden dicha oscilación; por otro lado, la expresión de *pdf^{ARNi};pdfRED* (verde) no difiere del control. Los datos representan dos experimentos independientes (N=2) y un mínimo de 16 cerebros analizados por CT/genotipo (n=8-10). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas con un $p < 0.05$ (ANOVA de dos vías, seguido de un *Tukey post-hoc test*).

En resumen, tanto con niveles reducidos y constantes de PDF (mediante la expresión del *pdf^{ARNi}*) como luego de alterarlos sutilmente por la mañana (mediante la expresión del *pdf^{ARNi};pdfRED*) correlacionan con arborizaciones complejas que no cambian a lo largo del día. Una hipótesis a testear es que exista una regulación recíproca entre ambos grupos neuronales por la cual la disminución de PDF en las sLNvs provoque un aumento de niveles/liberación del neuropéptido proveniente de las ILNvs. En este sentido, el hecho que disminuir los niveles del transcripto *pdf* en las ILNvs también correlacione con la pérdida de la plasticidad estructural (Figura 26 B), sugiere que ambos grupos neuronales contribuyen a este fenómeno.

Todos estos resultados indican que la procedencia del neuropéptido PDF y su relación con el fenómeno de plasticidad estructural es aún más compleja de lo que se hipotetizaba, y que los niveles de PDF y/o la activación de su vía de señalización juegan un papel preponderante regulando los mecanismos reclutados diferencialmente a lo largo del día para llevar a cabo la remodelación estructural.

2. Modulación aguda de los niveles de PDF en las LNvs

Ya hemos visto la relevancia de PDF y su oscilación para la remodelación estructural circadiana y cómo estos *outputs* del reloj dependen tanto de un reloj funcional en las LNvs como así también de otros relojes, los presentes en la glia. Además, demostramos que el fenómeno de remodelación es dependiente de los niveles de neuropéptido, y que en estos cambios de conectividad colaboran tanto sLNvs como las ILNvs.

Dado el tenor de los cambios que se observan a lo largo del día en las terminales (Gorostiza et al., 2014) propusimos que a lo largo del día podrían reclutarse distintos mecanismos celulares (neuritogénesis, sinaptogénesis, cambios en el grado de fasciculación, retracción de neuritas primarias y secundarias, etc). Para profundizar en esta caracterización, se evaluó si el neuropéptido PDF modula la remodelación de las terminales en momentos particulares del día. Para ello día se utilizó un sistema de inducción aguda por tiempos cortos. En todos los casos se utilizó una línea de *pdf^{ARNi}*, previamente empleada por nuestro laboratorio (Gorostiza et al., 2014).

Para definir el tiempo de inducción necesario y suficiente para generar cambios significativos en los niveles de PDF en las terminales dorsales, se realizaron inducciones de 12hs, 24hs y 48hs en presencia de RU en animales CD8:GFP;*pdf*-GS>*pdf^{ARNi}* y se midieron los niveles de PDF en las proyecciones por inmunohistoquímica. Si bien 12hs en presencia del inductor resultó suficiente para expresar niveles detectables del marcador de membrana CD8:GFP, no resultó suficiente para conseguir el silenciamiento efectivo a través de *pdf^{ARNi}* o *pdf^{ARNi}*. Por otro lado, en 48hs los niveles del neuropéptido disminuyen al 50% de los observados en el control, mientras que a 24hs esta

diferencia es menos pero significativa. Es así que se realizaron inducciones de 24hs (Ver Anexo, Figura 36)

2.1. Niveles transcripcionales de *pdf*

Para medir la efectividad del *pdf*^{ARNi} luego de las inducciones de 24hs, se realizó la extracción de ARN total de cabeza y se midieron los niveles del transcripto de *pdf* (ARNm) por qPCR (Figura 27 A). Tal como se desprende de la figura los niveles de *pdf* disminuyeron al expresar el ARN de interferencia (Figura 27 B) en los dos momentos del día examinados. Los niveles de mensajero de *pdf* no varían a lo largo del día en el control, y la expresión del *pdf*^{ARNi} disminuye los niveles de transcripto alrededor de un 50% en ambos casos.

Para corroborar el funcionamiento de la herramienta en un esquema experimental similar al empleado en secciones anteriores se realizó el mismo experimento empleando el sistema termosensible con *tub-Gal80*^{TS} (previamente descrito). Se observó el mismo resultado con ambos sistemas de inducción, sugiriendo que luego de 24h la expresión de *pdf*^{ARNi} es efectiva para disminuir los niveles del transcripto aproximadamente a la mitad (Datos no mostrados).

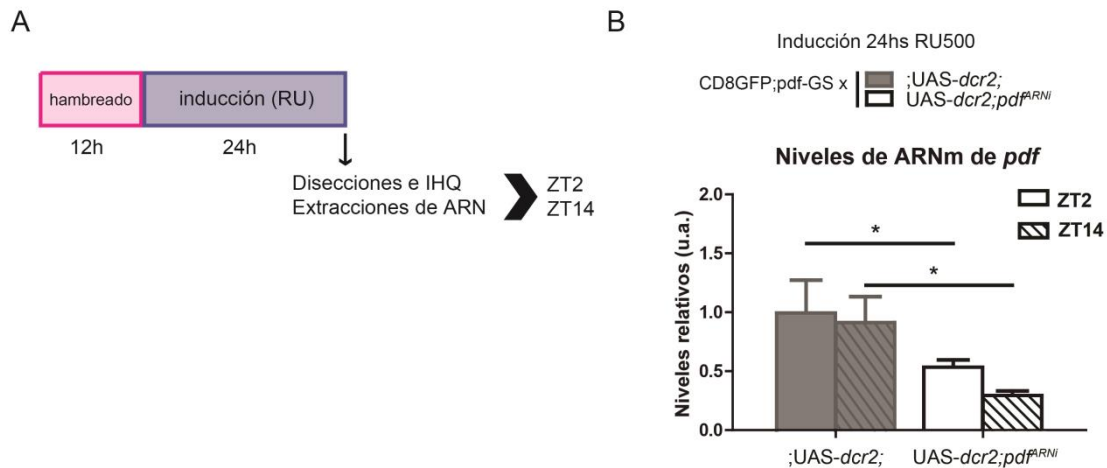


Figura 27: Disminución aguda de los niveles de *pdf*. Cuantificación de los niveles de ARNm total de cabeza de *pdf* por *real-time* q-PCR. **A.** Esquema de trabajo. Los animales fueron hambreados por 12 horas para luego ser transferidos a comida con RU-486 tanto a ZT2 como a ZT14. 24 horas después se obtuvieron las cabezas, para disectar cerebros o para la extracción de ARNm. **B.** Cuantificación de los niveles relativos de *pdf* por qPCR. Los niveles fueron normalizados al gen de referencia *rpl49*. Las barras grises corresponden al control (UAS-dcr2), y las blancas a los animales tratados con el ARNi para *pdf* (UAS-dcr2;pdf^{ARNi}), bajo el control de *pdf*-GS. Un *test t de Student* muestra diferencias significativas entre los niveles de expresión. El asterisco (*) indica diferencias significativas con un $p < 0.05$. Tres experimentos independientes fueron realizados, N=3.

Curiosamente, en la literatura el análisis de los niveles transcripcionales de *pdf* a lo largo del día se limita a experimentos de Northern Blot, realizados hace casi dos décadas (Park and Hall, 1998). Estudios posteriores analizaron los diferentes factores que afectan dichos niveles de ARNm (Mezan et al., 2016; Park et al., 2000; Sabado et al., 2017) por lo que aún no se cuenta con una curva temporal de los niveles transcripcionales de *pdf* realizada con una técnica más sensible, como es la qPCR. Esto nos llevó a analizar los niveles del *pdf* a lo largo del día.

Se realizó una curva temporal con resolución de 3hs de animales control (genotipo w^{1118}) para luego realizar PCR cuantitativas en tiempo real y medir los niveles del transcripto a lo largo de un ciclo bajo condiciones de sincronización (LD). Para nuestra sorpresa, los niveles de ARNm de *pdf* no son constantes a lo largo del día como había sido reportado, sino que tienen un máximo hacia el final de la noche (ZT20) (Figura 28). Esta diferencia no fue observada en los experimentos descriptos previamente ya que los niveles fueron analizados en otros puntos de la curva (ZT2 y ZT14, coincidentes con los momentos de máximo y mínimo niveles de PDF en las terminales del protocerebro dorsal (Figura 27 B)).

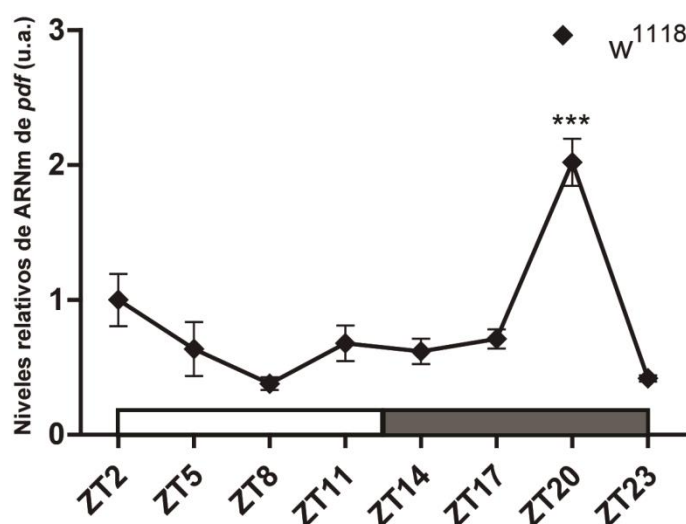


Figura 28: Curva temporal de niveles de *pdf*. Cuantificación por la técnica PCR cuantitativa (qPCR por su sigla en inglés) de los niveles de transcripto *pdf* en cabezas de animales w^{1118} (control) que se encontraban en LD. La barra blanca coincide con las luces prendidas, mientras que la barra gris las luces apagadas. Los niveles fueron normalizados al gen de referencia *rp49*. Las barras de error representan el E.E (error estándar). Los asteriscos (***) indican diferencias significativas con un $p < 0.001$ (ANOVA, seguido de *Tukey post-hoc test*). Se realizaron tres experimentos independientes, $N=3$.

Esta es la primer evidencia que muestra una oscilación en los niveles transcripcionales de *pdf* a lo largo del día.

2.2. Efectos sutiles en la inmunoreactividad de PDF

Luego de confirmada la eficacia de la línea *pdf*^{ARNi} en los dos momentos del día evaluados (ZT2 y ZT14), se procedió a analizar si la disminución observada a nivel transcripcional se veía reflejada en los niveles de PDF. Para ello, bajo el mismo esquema de trabajo (Figura 27 A), se examinó la inmunoreactividad de PDF en el protocerebro dorsal. Contrariamente a lo esperado, al cabo de 24h de inducción no se detectó una disminución significativa de la inmunoreactividad de PDF en ninguno de los puntos analizados (Figura 29 A y C); sin embargo, se observó una tendencia a menores niveles en el día y mayores en la noche respecto al control. Para examinar si la inducción aguda traía aparejada una reducción en la amplitud de las oscilaciones se relativizaron los niveles de la mañana a los de la noche (ZT2/ZT14), y se pudo observar que dicha oscilación disminuye y resulta significativamente distinta a la observada en el control (Figura 29 B). Esto indica que si bien en 24hs se logra la reducción del transcrito a un 50% de los valores esperables en el control, esa caída no se refleja en una reducción equivalente en las vesículas conteniendo el neuropéptido en el protocerebro.

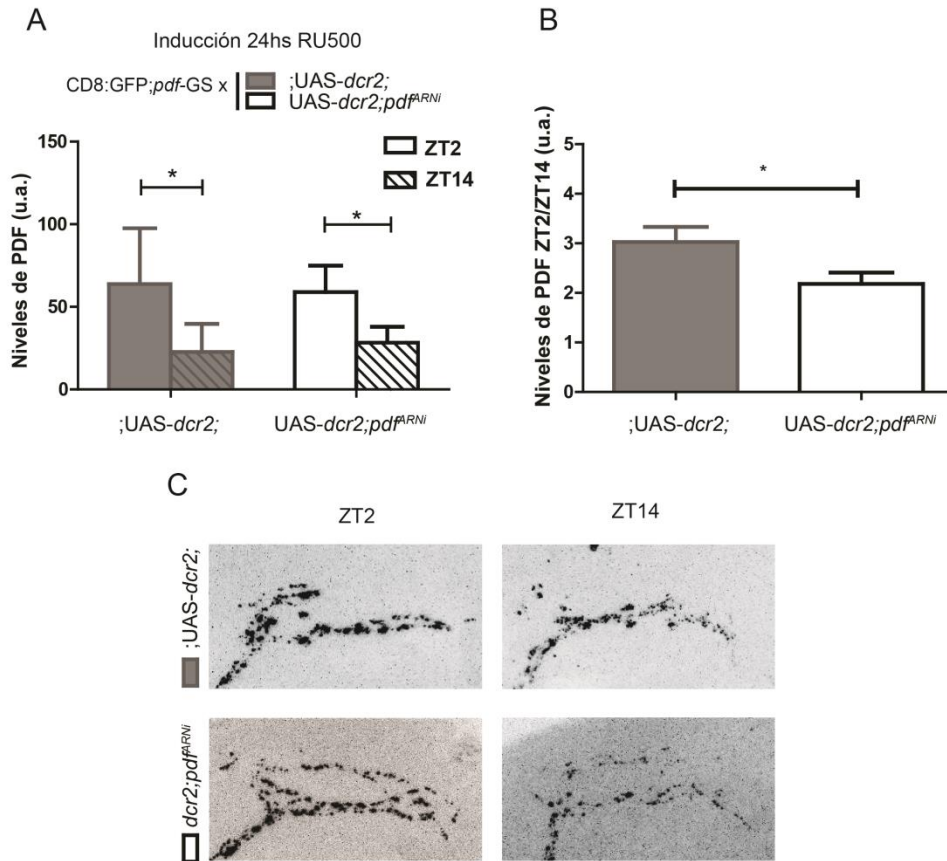


Figura 29: La disminución aguda de los niveles del ARNm de *pdf* altera sutilmente la oscilación de PDF en las terminales dorsales. **A.** Cuantificación de los niveles de PDF de cerebros de animales que fueron disectados 24hs después de haber sido inducidos con RU, para activar *GeneSwitch*, a ZT2 y ZT14. Los niveles de PDF aún oscilan en presencia del ARNi para *pdf* (blanco) entre la mañana y la noche, al igual que el control (gris). **B.** Coeficiente de los niveles de PDF, ZT2/ZT14. Como se observa, la amplitud de la oscilación de los animales tratados (blanco) es distinta al control (gris). El asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas, con un $p < 0.05$ (ANOVA de una vía seguido de un Fisher post-hoc test). Se realizaron tres experimentos independientes, con un mínimo de 24 cerebros analizados ($N=3$, $n=7-10$). **C.** Imágenes representativas de microscopía confocal de PDF en las terminales del protocerebro dorsal de animales bajo el control de CD8GFP;*pdf*-GS.

2.3. Pérdida de la remodelación estructural

Una vez corroborado que los niveles de PDF en las terminales de las sLNvs sólo cambian sutilmente luego de la disminución aguda del transcripto correspondiente, se propuso evaluar si cambios sutiles en los niveles de PDF podrían afectar la remodelación de las terminales en ventanas acotadas del día.

Inesperadamente, encontramos que aún bajo estas condiciones no hay plasticidad estructural de las terminales dorsales. Las proyecciones exhibieron terminales muy arborizadas a lo largo del día, reminiscentes a un control por la mañana (Figura 30 A y B).

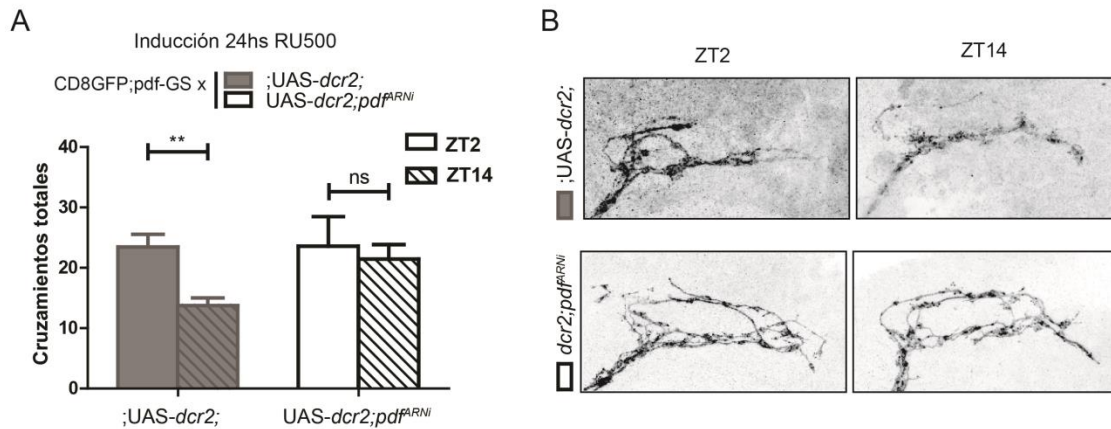


Figura 30: La disminución en la amplitud de oscilación de los niveles de PDF afecta de forma drástica la plasticidad estructural. Los animales fueron disectados 24hs después de haber sido inducidos con RU, para activar *GeneSwitch*, a ZT2 y ZT14. **A.** Cuantificación de los cruzamientos totales. Animales control (gris) muestran la remodelación circadiana de sus terminales, mientras que animales con *pdf^{RNAi}* no muestran dicho fenómeno. El asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas con un $p < 0.05$ (ANOVA de una vía, seguido de un *Fisher post-hoc test*). Se realizaron tres experimentos independientes, con un mínimo de 24 cerebros analizados ($N=3$, $n=7-10$). **B.** Imágenes representativas de microscopía confocal mostrando la expresión de CD8GFP en las terminales del protocerebro dorsal de animales *pdf-GS*.

Estos resultados aportan nueva evidencia respecto de la relevancia de los niveles de PDF para la plasticidad estructural, ya que cambios sutiles en la inmunoreactividad dentro de las terminales dorsales se asocian a una marcada alteración de la remodelación de las mismas. Además, confirma la íntima relación entre estos dos *outputs* del reloj, aunque aún se desconocen los mecanismos a través de los cuales interactúan. Por el momento se conoce que ambos dependen del correcto funcionamiento del reloj molecular (Fernandez et al., 2008; Herrero et al., 2017; Park et al., 2000) y que son modulados por cambios en la excitabilidad de las LNvs (Depetris-Chauvin et al., 2011; Fernandez et al., 2008; Lear et al., 2005).

3. La actividad eléctrica neuronal y su relevancia sobre *outputs* del reloj

Tanto en *Drosophila* como en mamíferos hay abundante evidencia acerca del impacto del reloj molecular sobre la excitabilidad de las neuronas reloj, que se manifiesta a través de cambios a lo largo del día en las conductancias, el potencial de reposo y, en definitiva, patrones circadianos de disparos de potenciales de acción (revisado recientemente en Allen et al.,

2017). Durante el día, las neuronas reloj presentan mayor actividad espontánea, la cual se encuentra asociada a una mayor conductancia de Na^+ voltaje dependiente. Mientras que por la noche diferentes tipos de canales de potasio (K^+) regulan el patrón de disparos de potencial de acción. Además, la actividad eléctrica de la membrana plasmática señalaría a través de cambios en el calcio (Ca^{2+}) intracelular y el AMP cíclico (AMPC) para regular la actividad del reloj. Se ha reportado que la hiperexcitación de las sLNvs por una corriente de Na^+ resulta en patrones complejos de actividad locomotora. Estos experimentos sugieren un rol para PDF y la actividad eléctrica como sincronizadores de múltiples osciladores neuronales independientes (Nitabach et al., 2006).

Teniendo en cuenta estos antecedentes resulta natural que alterar la actividad eléctrica podría modificar los *outputs* del reloj, tanto los niveles de dicho neuropéptido como también de la remodelación circadiana de sus terminales.

Una evidencia a favor de que alterar la excitabilidad neuronal afecta la plasticidad estructural se obtuvo, indirectamente, al combinar fluoróforos de membrana para analizar en detalle el proceso de remodelación; curiosamente, animales control expresando conjuntamente CD8-GFP y myr-RFP mostraron terminales poco arborizadas, que no cambiaban su estructura a lo largo del día. Esta observación inicial fue repetida en varios experimentos combinando líneas distintas; el efecto fue atribuido a la sobrecarga de la membrana de las sLNvs (Ver Anexo, Figura 37).

Para comprender la manera en que cambios en la excitabilidad neuronal modulan los niveles de PDF, se expresó un canal iónico sensible a temperatura, TrpA1 (Hamada et al., 2008). La activación de TRPA1 se limitó a la incubación de los animales por 2 horas a 30°C (Petsakou et al., 2015; Sivachenko et al., 2013); en estas condiciones se espera depolarizar de forma aguda las neuronas PDF exclusivamente.

3.1. ***Depolarizar las LNvs afecta los niveles de PDF en forma diferencial a lo largo del día***

Las LNvs son más activas durante el día que por la noche (Cao and Nitabach, 2008; Muraro and Ceriani, 2015). Si bien no ha sido demostrado experimentalmente, se ha propuesto que la diferencia de niveles de PDF en las terminales se asocia a una liberación diferencial a lo largo del día. En este sentido se esperaba que como resultado de la depolarización aguda de las LNvs, ocurriera la liberación masiva del contenido vesicular de las terminales de las sLNvs. El experimento se realizó en animales *CD8:GFP;pdf-GS, dcr2>UAS-trpA1* mantenidos en comida con inductor por 48 horas (para permitir la visualización del fluoróforo de membrana y la expresión de la versión no activa del canal TRPA1), los cuales se transfirieron a 30°C por 2hs para inducir la activación del canal iónico, y por lo tanto, la depolarización a “corto plazo” de las LNvs. Los resultados se muestran en la Figura 31.

Contrariamente a lo esperado, la depolarización aguda de las LNvs al inicio del día subjetivo no tuvo efecto sobre los niveles (inmunoreactividad) de PDF en las terminales dorsales, que son indistinguibles de los del control (Figura 31 B). Por otro lado, la depolarización forzada al inicio de la noche subjetiva resultó en un aumento significativo de los niveles de PDF en las terminales, comparables a los del día tanto en animales control como tratados (Figura 31 A y B). Estos resultados sugieren que durante el día subjetivo las LNvs se encuentran en un estado de máxima depolarización (que depende de propiedades intrínsecas de la membrana definidas por el reloj, entre ellas el tipo y densidad de canales iónicos) de modo que la depolarización forzada por activación del canal TRPA1 no tiene efecto adicional y los niveles de PDF se mantienen inalterados. Una interpretación alternativa para este interesante resultado es que los procesos que determinan los niveles de PDF en las terminales (como la síntesis/ transporte/ reclutamiento/ liberación) están en su máxima capacidad y la depolarización mediada por TRPA1 no los afecta (Nitabach et al., 2006). Por el contrario, durante la noche subjetiva la misma depolarización forzada tiene un claro efecto en la excitabilidad de las LNvs, y por lo tanto, en uno de sus *outputs* más estudiados: los niveles de PDF.

Estos resultados corroboran que los niveles de PDF no sólo son modulados por el reloj sino también por la actividad eléctrica. Futuros experimentos permitirán develar si esta regulación es a nivel transcripcional (a través de factores de transcripción de tipo *Mef2*, cuya expresión depende tanto de la actividad eléctrica como del reloj molecular, (Sivachenko et al., 2013)) o es una acción directa sobre los niveles del neuropéptido en las terminales.

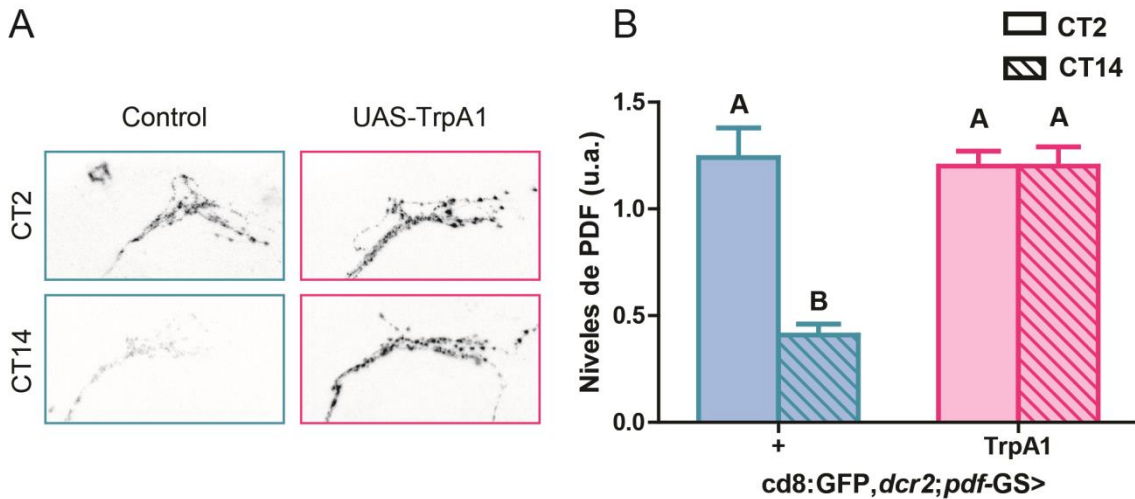


Figura 31: La depolarización de las neuronas LNvs provoca un aumento en los niveles de PDF de forma diferencial a lo largo del día. Animales adultos fueron colocados en comida con RU por 48hs para permitir la visualización del fluoróforo de membrana CD8:GFP, luego se les dio un shock de 30°C para activar el canal iónico TrpA1 por solo dos horas, después de las cuales se disectaron los cerebros, tanto a CT2 como CT14. **A.** Imágenes representativas de microscopía confocal, de PDF en las terminales del protocerebro dorsal de animales control (celeste) y animales que expresan TrpA1 (rosa) bajo el control de CD8:GFP, *dcr2*; *pdf*-GS. **B.** Cuantificación de los niveles de PDF de cerebros de animales que fueron disectados 2hs después de haber sido inducidos a 30°C, para activar TRPA1, a CT2 y CT14. Los niveles de PDF oscilan en el control (celeste) pero no así en presencia de TrpA1 (rosa). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas con un $p < 0.05$ (ANOVA de una vía *Kruskal-Wallis*, seguido de un *Conover post-hoc test*, $n=7-10$, $N=3$).

3.2. Efectos de la depolarización sobre la plasticidad estructural

Resultados previos de nuestro laboratorio muestran que tanto la hiperpolarización como la depolarización crónica en el cerebro adulto afectan la remodelación de las terminales (Depetris-Chauvin et al., 2011; Gorostiza et al., 2014). Puesto que una breve depolarización forzada afecta los niveles de PDF, se decidió examinar el impacto de esta desregulación acotada en el fenómeno de plasticidad estructural. Para ello se empleó el mismo paradigma experimental en los mismos genotipos.

La depolarización aguda de las LNvs al inicio de la noche subjetiva resulta en terminales complejas, muy ramificadas, semejantes a las de un

control por la mañana, tal como ya había sido reportado (Petsakou et al., 2015; Sivachenko et al., 2013). Por otro lado, la depolarización aguda al inicio de la mañana subjetiva no tuvo efecto sobre las arborizaciones, las cuales se mantienen constantes a lo largo del día (Figura 32 B). Estos resultados evidencian que la excitabilidad neuronal afecta paralelamente a las oscilaciones de los niveles de PDF y al fenómeno de plasticidad estructural circadiana, aunque no permiten discernir si ambos *outputs* están regulados directa (e independientemente) por cambios en la actividad o si son interdependientes.

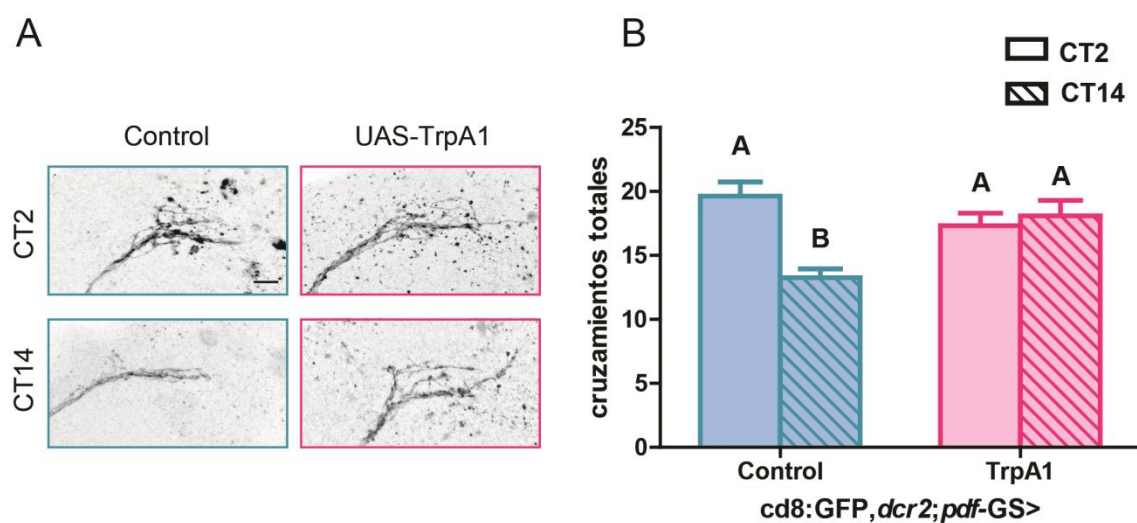


Figura 32: Alterar la actividad eléctrica de las LNvs provoca alteraciones en la remodelación estructural circadiana. Animales adultos fueron colocados en comida con RU por 48hs para permitir la visualización del fluoróforo de membrana CD8:GFP, luego se les dio un shock de 30°C para activar el canal iónico TrpA1 por solo dos horas, después de las cuales se disectaron los cerebros, tanto a CT2 como CT14. **A.** Imágenes representativas de microscopía confocal, de CD8:GFP en las terminales del protocerebro dorsal de animales control (celeste) y animales que expresan TrpA1 (rosa) bajo el control de CD8:GFP, *dcr2;pdf-GS*. **B.** Cuantificación de los cruzamientos totales. Animales control (celeste) muestran la remodelación circadiana de sus terminales, mientras que animales con TrpA1 (rosa) no muestran dicho fenómeno. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas con un $p < 0.05$ (ANOVA de una vía, seguido de un *Tukey post-hoc test*, $n=7-10$, $N=3$).

3.3. La depolarización aguda de las LNvs es suficiente para rescatar los niveles de PDF

Los resultados presentados a lo largo de esta tesis muestran el impacto de alterar los niveles de PDF en el fenómeno de remodelación. En ese contexto resulta de interés indagar en los mecanismos de regulación de los niveles del propio neuropéptido. Para corroborar si sus niveles en las terminales axonales dependen directamente del control circadiano de la excitabilidad neuronal se evaluó si la depolarización aguda y acotada (2hs) de las LNvs podría

contrarrestar (lo que en la jerga genética se denomina “rescatar”) la reducción en los niveles de PDF asociada a la expresión del *pdf^{ARNi}* (descrito en la Figura 31).

Llamativamente, el análisis de la inmunoreactividad de PDF en las terminales mostró que la depolarización forzada resultó en niveles elevados de PDF tanto en el día (CT2) como la noche subjetiva (CT14) (Figura 33 A y B). Estos resultados son muy interesantes, ya que sugieren que depolarizar las LNvs modula activamente el reclutamiento de vesículas PDF+ hacia las terminales ya sea aumentando la traducción local (cambios transcripcionales/traduccionales en el soma resultan menos probables dada la ventana acotada), el llenado de las vesículas y/o el transporte hacia el protocerebro dorsal. De hecho, existen evidencias de que cambios en la excitabilidad de las terminales neuronales aumentan la movilidad de las vesículas donde se almacenan neuropéptidos (DCV, del inglés, *dense core vesicles*), su interacción con la membrana y su liberación al espacio sináptico (Ng et al., 2002; Shakiryanova et al., 2007; Shakiryanova et al., 2005). Por otro lado, estos resultados descartarían la interpretación que la depolarización resulta en el incremento de la tasa de liberación, ya que se esperaría una reducción de los niveles de PDF si ese fuera el caso.

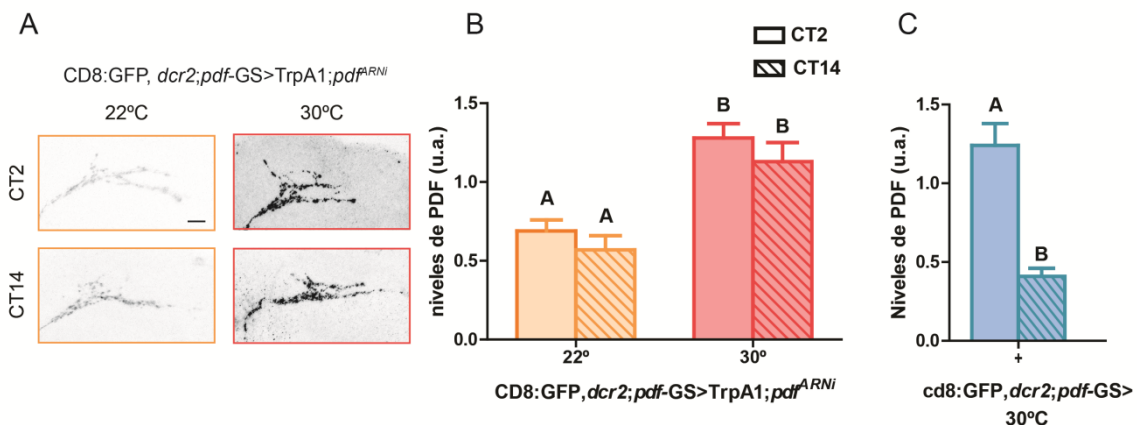


Figura 33: La depolarización de las LNvs rescata los niveles de PDF en las terminales dorsales. Animales adultos fueron colocados en comida con RU por 48hs para permitir la visualización del fluoróforo de membrana CD8:GFP y la acción del ARNi de *pdf*. A continuación se les dio un shock de 30°C para activar el canal iónico TrpA1 por solo dos horas, inmediatamente se disectaron los cerebros, tanto a CT2 como CT14. **A.** Imágenes representativas de microscopía confocal, mostrando los niveles de PDF en las terminales del protocerebro dorsal de animales control que se mantuvieron a 22°C (amarillo) y animales que fueron transferidos a 30°C (rojo), expresando tanto TrpA1 como *pdf^{ARNi}* bajo el control de CD8:GFP, *dcr2; pdf-GS*. **B.** Cuantificación de los niveles de PDF de cerebros de animales que fueron disectados 2hs después de haber sido inducidos a 30°C, para activar TrpA1, a CT2 y CT14. Los niveles

de PDF son bajos y constantes en el control donde es sólo activo el *pdf^{ARNi}* (amarillo), mientras que son altos y constantes cuando además es activado TrpA1 (rojo). Letras iguales indican que no hay diferencias estadísticamente significativas con un $p > 0.05$ (ANOVA de una vía *Kruskal-Wallis*, seguido de un *Conover post-hoc test*, $n=7-10$, $N=3$). **C.** Control *cd8:GFP, dcr2; pdf-GS>+* a 30°C, correspondiente a Figura 31 B. Los resultados no son comparables con los mostrados en B., pero se incluyen como referencia para facilitar la interpretación de los datos.

Tanto la depolarización forzada como la disminución acotada (24hs) de los niveles de PDF en el cerebro adulto se asocian a proyecciones complejas, más arborizadas, que no se modifican a lo largo del día. Tal como se mencionó en el párrafo anterior, es posible proponer al menos dos escenarios para entender esta interrelación. Por un lado, cambios en la excitabilidad podrían provocar cambios en los niveles de neuropéptido y éste, a través de su vía de señalización, mediar en el proceso de remodelación, alterando perfiles transcripcionales (Mezan et al., 2016; Sabado et al., 2017) o por regulación local (Seluzicki et al., 2014). Alternativamente, ambos procesos podrían actuar paralelamente sobre el proceso de remodelación; en este escenario se esperaría que la depolarización forzada en contexto de la reducción de los niveles de PDF podría resultar en terminales de complejidad exacerbada, superior a la que se observa en los controles durante el día subjetivo. Sin embargo, la expresión sostenida (por 48hs) de *pdf^{ARNi}* se asocia a proyecciones menos complejas (Figura 34 B, a 22°C), observación que contrasta con el efecto más agudo (<24hs, Figura 30).

Para discernir entre estas posibilidades se analizó la estructura de las terminales dorsales en el contexto experimental descrito en la sección previa. Llamativamente, encontramos que, independientemente de los niveles de PDF (es decir, en controles -Figura 32- o en contexto de la expresión del *pdf^{ARNi}* – Figura 34-), la depolarización aguda de estas neuronas aumenta el grado de arborización de las terminales, aumentando la generación de nuevas neuritas (Figura 34 A y B).

Hasta ahora, no se había investigado las consecuencias directas (a corto plazo) de modular la actividad eléctrica de las LNvs sobre estos dos *outputs* del reloj: la oscilación circadiana de los niveles de PDF y la remodelación estructural de las terminales dorsales. Una posible interpretación es que el control circadiano de la excitabilidad neuronal tiene un rol fundamental en la regulación directa de los niveles de PDF, y éste, a su vez, medie el proceso de

remodelación estructural. Alternativamente, PDF en las terminales podría modular la actividad localmente a través de canales activables por nucleótidos cíclicos (Seluzicki et al., 2014), y de este modo mediar el proceso de remodelación. Futuros experimentos serán necesarios para esclarecer dichas posibilidades.

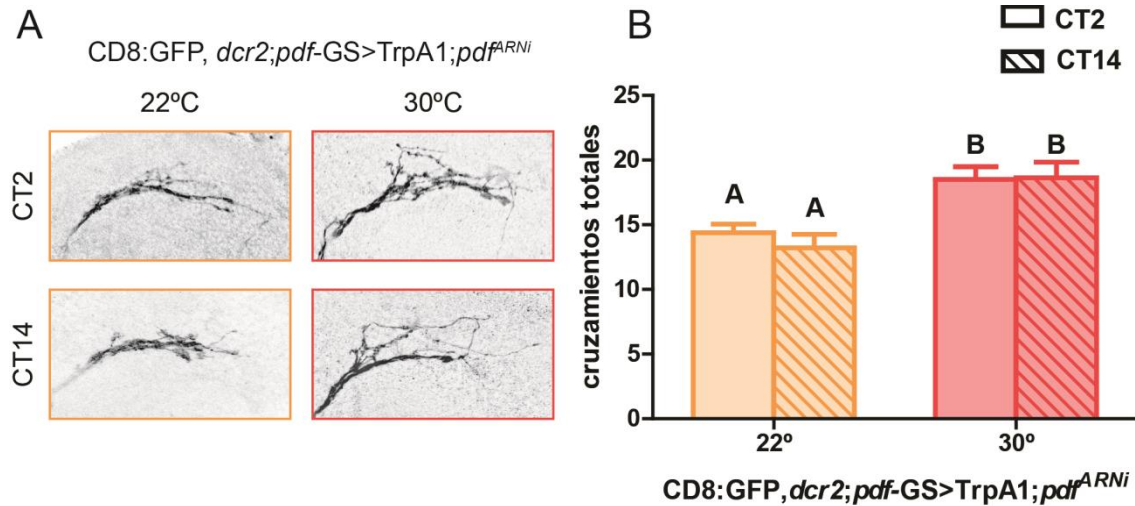


Figura 34: La depolarización de las LNvs aumenta el número de nuevas neuritas. Animales adultos fueron colocados en comida con RU por 48hs para permitir la visualización del fluoróforo de membrana CD8:GFP y la acción del ARNi de *pdf*. A continuación se les dio un shock de 30°C para activar el canal iónico TrpA1 por solo dos horas, inmediatamente se disectaron los cerebros, tanto a CT2 como CT14. **A.** Imágenes representativas de microscopía confocal de CD8:GFP en las terminales del protocerebro dorsal de animales control que se mantuvieron a 22°C (amarillo) y animales que fueron colocados a 30°C (rojo), todos expresando tanto TrpA1 como *pdf^{ARNi}* bajo el control de CD8:GFP, *dcr2;pdf-GS*. **B.** Cuantificación de los cruzamientos totales de las terminales dorsales. Los entrecruzamientos son bajos y constantes en control donde sólo es activo el *pdf^{ARNi}* (amarillo), mientras que son altos y constantes cuando además es activado TrpA1 (rojo). Letras iguales indican que no hay diferencias estadísticamente significativas con un $p > 0.05$ (ANOVA de una vía, seguido de un Tukey post-hoc test, $n=7-10$, $N=3$).

Discusión y conclusiones

Hace unos años nuestro laboratorio describió por primera vez cambios a lo largo del día en la morfología de las proyecciones de un grupo central de “neuronas reloj”, fenómeno que denominamos “plasticidad estructural circadiana” (Fernandez et al., 2008; Muraro et al., 2013). Puesto que estas neuronas -las sLNv- cumplen un papel fundamental en el circuito que controla los ciclos de actividad y reposo en la mosca adulta es posible que la plasticidad estructural contribuya a dicha ritmicidad. Las neuronas sLNvs son 4 por hemisferio; los somas se encuentran en la médula accesoria y proyectan dorsoventralmente hacia el protocerebro dorsal donde residen otros grupos de neuronas reloj. Los cambios estructurales más dramáticos se observan justamente en las terminales del protocerebro dorsal. Un análisis más detallado de la morfología de las terminales (limitado a la resolución provista por un microscopio confocal) sugiere que por la mañana se generan nuevos procesos, más elaborados y ramificados; las neuritas primarias están separadas entre sí y se logra detectar un mayor número de botones sinápticos; por otro lado, al inicio de la noche aumenta el grado de fasciculación entre neuritas primarias y se detecta un número menor de botones sinápticos; finalmente, hacia el final de la noche las neuritas principales recorren se acortan significativamente, si bien el número de botones sinápticos no parece modificarse (Gorostiza et al., 2014). Si en lugar de hacer un análisis poblacional por tinción de inmunohistoquímica se analizan los cambios en los mismos cerebros mantenidos *ex vivo*, se identifican principalmente cambios en el grado de fasciculación (en un 80% de los cerebros analizados), cambios en la posición de los botones sinápticos (cerca del 50% de los cerebros analizados) así como la aparición de nuevas neuritas (en un 30% de los cerebros) al compararlos entre una noche y la mañana subsiguiente (Gorostiza et al., 2014).

Esas observaciones iniciales permitieron generar descubrimientos adicionales, como que esta remodelación circadiana involucra cambios en el número de sinapsis y conectividad, y concomitantemente, que las neuronas sLNvs se contactan con diferentes targets postsinápticos a lo largo del día (Gorostiza et al., 2014); estos descubrimientos llevaron a proponer que la plasticidad estructural resulta en cambios en la fuerza de la comunicación entre grupos circadianos, lo que podría contribuir a la adaptación estacional (Gorostiza et al., 2014; Petsakou et al., 2015). La remodelación estructural

circadiana se ha observado tanto en estructuras del cerebro correspondientes al reloj, como en otras regiones del mismo que reciben *inputs* de este oscilador (Bosler et al., 2015); cabe destacar que se ha demostrado que coexisten con cambios circadianos en la excitabilidad neuronal y la eficiencia sináptica dentro y fuera de las estructuras reloj, pero la relación precisa entre estas dos formas de plasticidad aún no es fácil de explicar (Frank and Cantera, 2014).

Mecanismos autónomos de célula subyacen a la remodelación continua de las terminales neuronales

Los cambios rítmicos en la morfología neuronal reportados, al menos en *Drosophila*, incluyen aquellos de calibre axonal, complejidad de arborizaciones, vesículas sinápticas y número de sinapsis. Una de las estructuras que experimenta cambios diarios y circadianos es el sistema visual, el cual muestra cambios en el número de contactos sinápticos como también en la morfología de sus neuronas y células de la glia (Damulewicz et al., 2013; Gorska-Andrzejak et al., 2013; Pyza and Meinertzhagen, 1999; Weber et al., 2009); otro ejemplo caracterizado son los cambios cíclicos en la morfología exhibidos por las neuronas motoras del adulto (Mehnert et al., 2007; Mehnert and Cantera, 2008; Ruiz et al., 2010; Ruiz et al., 2013), y también en interneuronas del cerebro central (Fernandez et al., 2008).

Dada la naturaleza de los cambios que se van observando a lo largo del día, es posible que el reloj molecular reclute distintos procesos celulares para llevar a cabo la remodelación estructural. En cuanto a los mecanismos celulares subyacentes, contribuciones de nuestro laboratorio y de otros han mostrado que la plasticidad estructural circadiana depende de un reloj funcional (Fernandez et al., 2008; Herrero et al., 2017), es sensible a cambios de excitabilidad de la membrana (Depetris-Chauvin et al., 2011) a través de la actividad del factor de transcripción MEF2, cuya expresión depende del reloj circadiano y de la actividad neuronal; MEF2 a su vez regula la expresión de genes efectores responsables de parte de los cambios estructurales, por ejemplo de Fasciclin II (Sivachenko et al., 2013). Como parte del proceso de

remodelación también se recluta a una metaloproteasa de matriz extracelular llamada MMP1, quien a su vez modula los niveles del neuropéptido PDF, el cual, a través de un mecanismo aún desconocido, afecta el proceso de la remodelación (Depetris-Chauvin et al., 2014). El proceso también recluta mecanismos involucrados en la remodelación del citoesqueleto de actina (Petsakou et al., 2015), aunque la temporalidad de estos eventos no se ha explorado de ninguna forma.

Como en el caso de tantos *outputs* controlados por el reloj, se esperaba que al menos parte de las moléculas activamente responsables de orquestrar la remodelación estructural mostrasen una modulación circadiana de su expresión génica, estabilidad proteica y/o de su actividad. Consecuentemente, la remodelación circadiana debería ser directamente controlada por un reloj circadiano autónomo de célula, por ejemplo, el que opera en esas neuronas específicas, una posibilidad que no se había explorado hasta el inicio de esta tesis. Entonces, para examinar si el reloj dirige la remodelación estructural utilizamos diferentes estrategias genéticas para alterar las oscilaciones moleculares. Sorprendentemente, mientras que el silenciamiento adulto-específico de los represores del reloj molecular (a través de la expresión de *per*^{ARNi} y *tim*^{ARNi}) resultaron en patrones de arborización menos complejos, alterar la activación transcripcional del dímero CLK/CYC (a través de la expresión del dominante negativo de CYC, *cyc*^{DN}) se corresponde con la máxima complejidad de las terminales, a pesar de que las distintas estrategias empleadas provocan una alteración similar en las oscilaciones de los niveles de ARNm de estos genes reloj. Sin embargo, una inspección más detallada de la arquitectura de las arborizaciones sugiere que fenómenos adicionales son afectados; particularmente en el caso del dominante negativo de CYC, *cyc*^{DN}, donde no sólo las terminales son más complejas durante el día, sino que además la integridad de la membrana parece estar severamente alterada, de un modo que no se ha visto en los controles en ninguna condición. Se requieren experimentos adicionales para entender este proceso por completo; un candidato obvio que podría mediar la morfología alterada es la modulación circadiana de la dinámica de actina (Petsakou et al., 2015) que impacta directamente en la integridad estructural y la plasticidad de las neuronas y sus

sinapsis. Estos resultados indican que el reloj circadiano no solo dirige la remodelación diaria sino que podría adicionalmente jugar un papel activo en el mantenimiento de la estructura neuronal (Mehnert and Cantera, 2011).

Efectos diferenciales derivados de la disrupción aguda y crónica del reloj

Al estudiar la naturaleza circadiana del fenómeno de remodelación en diferentes estructuras se puso en evidencia que los mutantes con pérdida de función *per*⁰¹ y *tim*⁰¹ no solo interfieren con los aspectos temporales de este fenómeno sino que se asocian a proyecciones alteradas, lo que sugiere que el reloj molecular juega un rol en el mantenimiento de la morfología normal (Mehnert and Cantera, 2011). Llamativamente, los mutantes nulos de *per* y *tim* muestran fenotipos opuestos en la arquitectura de sus terminales neuronales (Fernandez et al., 2008; Mehnert et al., 2007), sugiriendo que ambas proteínas podrían tener roles adicionales a aquellos de que llevan a cabo como parte de la maquinaria del reloj. Para ahondar en esta posibilidad, silenciamos tanto *per* como *tim* en cerebros adultos, una vez que toda la red circadiana está establecida y conectada. Contrariamente a lo observado en los mutantes nulos, el silenciamiento adulto-específico de ambos genes resulta en una estructura similar, que en todos los casos se asemeja a los patrones de arborización menos complejos observados en los controles por la noche (Herrero et al., 2017). Estos resultados refuerzan la noción de que las diferencias estructurales asociadas a las mutaciones de pérdida de función podrían develar procesos adicionales en los cuales estas proteínas están involucradas durante el desarrollo temprano o durante el establecimiento del circuito circadiano.

La contribución de los relojes de la glia a la plasticidad estructural de las sLNvs

A través de los años se ha establecido que la glia, en particular la comunicación neurona-glia, juega un papel activo en el control de outputs rítmicos, afectando la inmunoreactividad de PDF en las terminales dorsales y concomitantemente, al comportamiento rítmico (Ng et al., 2016; Ng et al., 2011; Suh and Jackson, 2007). Sorprendentemente, afectar los relojes de la glia *per*

se no impacta en los patrones de actividad locomotora, al menos bajo el silenciamiento crónico de los niveles de *per* (Ng et al., 2011).

En el sistema visual la remodelación circadiana de las terminales neuronales es usualmente dirigida por diferentes osciladores circadianos, y ocurre en los fotorreceptores, los osciladores periféricos más abundantes en la cabeza de *Drosophila* (Weber et al., 2009). En este último caso, la modificación circadiana que impulsa la remodelación probablemente deriva de los fotorreceptores, de las neuronas reloj PDF⁺ en el cerebro, así como también la glia circundante (revisado por (Gorska-Andrzejak, 2013)). Los cambios estructurales también correlacionan con cambios en la abundancia de un marcador presináptico de zonas activas llamado *Bruchpilot*, BRP (Gorska-Andrzejak et al., 2013). En este caso se ha reportado que al bloquear la función del reloj en la glia se altera, aunque no desaparecen, los cambios diarios en la acumulación de BRP en la lámina (Gorska-Andrzejak et al., 2013). En la mosca hogareña, las células de la glia cambian de tamaño en una fase contraria comparada a las neuronas, y la remodelación se ve afectada tanto al perturbar el metabolismo de la glia como también su comunicación (Pyza and Gorska-Andrzejak, 2004).

Para comenzar a evaluar si los relojes de la glia contribuyen a la remodelación estructural de las proyecciones de las LNV, se restringió la expresión pan-glial de CYC^{DN} al adulto. En estas condiciones la disrupción aguda (por 2 días) de los relojes de la glia alteró por completo la plasticidad estructural circadiana, resaltando su contribución activa en el proceso de remodelación. No obstante, bajo las mismas condiciones, la inmunoreactividad de PDF en las terminales dorsales no fue afectada respecto al control, inesperadamente desacoplando ambos outputs del reloj (Figura 23). A pesar de no poder corroborar bioquímicamente el efecto derivado del bloqueo a corto plazo del funcionamiento del dímero CLK/CYC, nuestros resultados sugieren que la remodelación estructural diaria de las terminales de las LNVs es aún más sensible a alteraciones fisiológicas de la glia que los niveles de PDF en las mismas terminales.

La comunicación neurona-glia participa activamente en la regulación circadiana de la remodelación de las terminales a pesar de que los mecanismos aún no han sido descritos (Herrero et al., 2017). Un escenario posible se basaría en la liberación circadiana de gliotransmisores, como ocurre en los astrocitos en mamíferos (como por ejemplo, ATP (Burkeen et al., 2011; Marpegan et al., 2011)), u otros ligandos descritos como mediadores de la comunicación neuro-glial; los candidatos a estudiar pertenecen a las vías de señalización de crecimiento de fibroblastos (FGF) y a la familia de Bone morphogenetic protein (BMP, (Awasaki et al., 2011; Fuentes-Medel et al., 2012; Stork et al., 2014). Estas moléculas pueden alterar la excitabilidad de las terminales neuronales, por último afectando mecanismos dependientes de actividad conocidos por ser requeridos para la plasticidad estructural (Sivachenko et al., 2013) , o por ser reclutados directamente durante el proceso de remodelación.

La remodelación estructural circadiana también ha sido descrita en los núcleos supraquiasmáticos (SCN) del cerebro de mamíferos. En particular, se han observado cambios cíclicos antifásicos en la glia que rodea a las neuronas VIP y AVP en el SCN de ratas y se ha propuesto que dichos cambios contribuyen a la sincronización del reloj a los ciclos de luz-oscuridad (Becquet et al., 2008). Aunque poco se sabe acerca de la remodelación estructural en el cerebro de los mamíferos, la conservación generalizada de los mecanismos subyacentes al reloj molecular permiten postular la ocurrencia de este fenómeno de plasticidad en el cerebro de los mamíferos.

La acción conjunta de las ILNvs y sLNvs modula la plasticidad estructural

La red circadiana de *Drosophila melanogaster* está comprendida por aproximadamente 150 neuronas, entre las cuales solo 6 expresan el neuropéptido PDF, las LNvs. Para profundizar la caracterización de los mecanismos que regulan la plasticidad estructural, analizamos la contribución de los niveles de PDF, los cuales están íntimamente relacionados al fenómeno de plasticidad (Depetris-Chauvin et al., 2014). Los resultados obtenidos durante esta tesis muestran que una alteración sutil en los niveles del neuropéptido

(indistinguibles mediante la técnica de inmunohistoquímica) son suficientes para interferir con la remodelación (Figura 30) de lo cual se desprende la importancia que su vía de señalización opere adecuadamente en cada momento del día. Para indagar en esta posibilidad se desregularon tanto los niveles de PDF como los de PDFR aisladamente en las sLNvs o en las ILNvs. Como era de esperar, los niveles de PDF en las terminales de las sLNvs se afectaron significativamente por expresión del *pdf^{ARNi}* en dichas neuronas (no así en las ILNvs, Figura 25); sin embargo, interferir con su señalización por expresión de *pdf^{ARNi}* en las sLNvs también alteró los niveles de PDF en dichas terminales, especialmente al comienzo del día (día subjetivo); estos resultados sugieren que PDF modula su acumulación en las terminales por mecanismos aun no dilucidados, pero que podrían depender de la actividad (Seluzicki et al., 2014).

En cuanto al fenómeno de plasticidad, tanto la expresión de *pdf^{ARNi}* como *pdf^{ARNi}* en las sLNvs se asocian a proyecciones complejas y constantes a lo largo del día, reminiscentes al control por la mañana (CT2) (Figura 26). Llamativamente, la expresión del *pdf^{ARNi}* en las ILNvs, si bien no afecta significativamente los niveles de PDF en las terminales, también altera la remodelación, y el grado de arborización de las proyecciones a lo largo del día es indistinguible del control por la mañana. Estos resultados sugieren que receptores de PDF localizados tanto en las terminales del protocerebro dorsal como en el compartimiento somatodendrítico de las sLNvs en la médula accesoria (atravesada por las proyecciones de algunas ILNvs en su trayecto contralateral) pueden sensar el PDF liberado por las sLNvs o ILNvs, respectivamente, y activar su cascada de señalización, mediando el proceso de remodelación a través de mecanismos aún desconocidos. En este sentido, una posibilidad es que los receptores en las terminales medien cambios rápidos, como los asociados a la apertura/cierre de canales, y por lo tanto, terminen modulando la actividad local (Seluzicki et al., 2014), y por lo tanto disparen mecanismos dependientes de actividad; por otro lado, los receptores localizados en el compartimiento somatodendrítico podrían mediar cambios dependientes de transcripción (Sabado et al., 2017).

La conectividad directa entre ILNvs y sLNvs ya ha sido demostrada, cuando al excitar específicamente las ILNvs (empleando la misma línea c929-Gal4) se observa un aumento de AMPc en las sLNvs, que estaría mediado por PDFR (Schlichting et al., 2016). Es interesante que esta conectividad parece tener un efecto diferencial en distintos outputs del reloj de las sLNvs; mientras que la expresión de pdf^{ARNi} en las ILNvs no afecta visiblemente los niveles de PDF en las terminales dorsales de las sLNvs, esa intervención tiene un claro efecto sobre la plasticidad estructural en dichas terminales, lo cual refrenda que ambos grupos contribuyen activamente a regular la plasticidad estructural.

Un aspecto que merece particular atención es el efecto diferencial de la expresión del pdf^{ARNi} . Resulta llamativo el hecho de observar niveles bajos de PDF en las terminales dorsales acompañados de mayor grado de arborización de los circuitos, más allá de la esperada pérdida de remodelación diaria (Figura 26) teniendo en cuenta lo demostrado previamente por nuestro laboratorio donde el silenciamiento crónico de *pdf* bajo el control de la línea *pdf*-Gal4 o *pdf*-GS genera circuitos poco complejos a lo largo del día (Gorostiza et al., 2014). Una posible explicación a esta paradoja podría ser el hecho que, en los experimentos llevados a cabo en esta tesis se evaluó la contribución relativa de cada subset de LNvs al fenómeno de remodelación en presencia del otro grupo funcional; este contexto permitiría la activación de mecanismos compensatorios por los cuales el proceso de remodelación se ve afectado diferencialmente.

Alterar de forma aguda y sutil los niveles de PDF es suficiente para interferir con el fenómeno de plasticidad estructural

Hasta este punto se ha evidenciado que mantener la oscilación en los niveles de PDF en las terminales dorsales resulta fundamental para regular el fenómeno de plasticidad estructural. Para continuar profundizando el rol de PDF, y particularmente abordar la posibilidad de un efecto diferencial de la activación de su vía de señalización a lo largo del día, buscamos acotar la expresión del pdf^{ARNi} a ventanas restringidas a lo largo del día (en ambos grupos, conjuntamente). La necesidad de activar la maquinaria de silenciamiento restringió el análisis a una inducción no inferior a 24hs (Ver

Anexo, Figura 36) la cual sólo afectó sutilmente los niveles del péptido en el protocerebro dorsal, (Figura 29 A y B), aunque esa disminución fue suficiente para interferir con el fenómeno de remodelación (Figura 30). De hecho, la disminución aguda y acotada de los niveles de PDF resulta en terminales arborizadas, semejantes a las del control a la mañana subjetiva a lo largo de todo el día. Estos resultados, junto con los descritos en la sección anterior (la disminución crónica en un *subset* de LNvs), sugieren fuertemente que el fenómeno de plasticidad es muy sensible a cambios en los niveles de PDF; los tratamientos menos efectivos en alterar el balance de la señalización de PDF; la expresión del *pdf*^{ARNi} en cada grupo separadamente o por poco tiempo - 24hs-, menos efectivos, se asocian a mayor complejidad. Por otro lado, una deficiencia sostenida en el tiempo (en forma aguda (48hs, Figura 34 o crónicamente (Gorostiza et al., 2014) se asocian a poca complejidad. Estos resultados refuerzan la estrecha relación entre los dos *outputs* del reloj de las sLNvs, aun cuando se desconocen los mecanismos a través de los cuales podrían interactuar.

El neuropéptido PDF modula la plasticidad estructural alterando la actividad en forma local

Abundan las evidencias que sostienen la importancia de la actividad eléctrica y la conectividad en la red circadiana como reforzadora de las oscilaciones moleculares en las neuronas reloj. En particular, la depolarización de la membrana, los niveles de calcio (Ca^{2+}) intracelular y los de AMPc serían reguladores importantes del reloj transcripcional/traducciona en mamíferos y, dado que también presentan modulación circadiana en el SCN, son tanto *inputs* como *outputs* del oscilador circadiano, y por lo tanto conforman un ciclo de retroalimentación positiva (Welsh et al., 2010). En *Drosophila* el silenciamiento eléctrico crónico de las neuronas PDF (desde el desarrollo) detiene las oscilaciones moleculares de proteínas clave en el funcionamiento del reloj adulto (Nitabach et al., 2002); aunque esos efectos sobre el reloj probablemente se asocien a condiciones fisiológicas alteradas (Depetris-Chauvin et al., 2011). A su vez, alterar los niveles de Ca^{2+} intracelular en las neuronas PDF conduce a alteraciones en el período de la actividad locomotora

y retrasa las oscilaciones moleculares del oscilador central (Harrisingh et al., 2007). Estos resultados llevaron a proponer que la modulación de los niveles de Ca^{2+} intracelular es un componente fundamental del reloj molecular en las neuronas marcapasos de la mosca. Asimismo, también hay evidencia de que el silenciamiento de las neuronas PDF restringido a la fase adulta afecta diversos *outputs* del reloj, como alterar los niveles de PDF en las terminales axonales (Depetris-Chauvin et al., 2011), e incluso reduce tanto el grado de arborización de las terminales axonales como también el número de zonas sinápticas activas (Gorostiza et al., 2014).

Para abordar posibles mecanismos por los cuales PDF podría afectar la plasticidad estructural, se analizó el efecto de la depolarización forzada (acotada) de las neuronas PDF, a través de la activación de un canal iónico llamado TrpA1, previamente caracterizado (Petsakou et al., 2015; Sivachenko et al., 2013). Al respecto se había mostrado previamente que la complejidad del circuito es significativamente mayor respecto al control por las noches (CT14) luego de una depolarización aguda (mantenido por 2hs a la temperatura de activación). Bajo estas condiciones se esperaría una masiva liberación de las vesículas densas cargadas con PDF (*dense core vesicles*), aunque este efecto no fue reportado en los trabajos publicados hasta el momento. La depolarización forzada de las LNvs dio como resultado terminales más arborizadas al comienzo de la noche subjetiva (reproduciendo los datos publicados), similares a las de la mañana en el control. Curiosamente, no se observaron diferencias luego de la depolarización aguda durante la mañana subjetiva, lo cual resulta en la pérdida de las diferencias en esos dos momentos del día. Esta falta de plasticidad circadiana acompaña la observación que los niveles de PDF se mantienen elevados y constantes en los dos momentos analizados. La ausencia de efecto de la depolarización aguda durante la mañana subjetiva, que corresponde al momento de máxima actividad intrínseca (caracterizada por ráfagas espontáneas de potenciales de acción tanto en las ILNvs como en las sLNvs, (Cao and Nitabach, 2008; Cao et al., 2013; Muraro and Ceriani, 2015)), podría deberse a que la activación de canales TrpA1 no modifique sustancialmente los niveles de Ca^{2+} alcanzables en ese momento del día por acción directa del reloj molecular sobre las conductancias específicas.

Estas observaciones permiten proponer que el reloj circadiano impone una restricción dependiente del momento del día a la actividad eléctrica de las LNvs (proceso que en la jerga se conoce como “*gating*”), y a través de ello define el fenómeno de remodelación y la regulación fina de los niveles de PDF. Respecto de los niveles de PDF, si bien los mecanismos involucrados no se han descifrado, es posible proponer que la depolarización forzada dispara un aumento de la traducción local o un reclutamiento más efectivo de vesículas hacia las terminales (transporte activo) asociadas al incremento en los niveles de neuropéptido.

Puesto que la reducción sostenida de la señalización de PDF se asocia a terminales menos complejas a lo largo del día, un fenotipo opuesto a la condición de depolarización forzada (que se asocia a terminales muy ramificadas, es decir, mayor complejidad) propusimos abordar una posible interrelación entre ambos. En un contexto genético de niveles reducidos de PDF (por expresión sostenida de *pdf^{ARNi}*), la depolarización forzada y acotada (por 2hs) rescata los niveles reducidos de PDF tanto en el día como en la noche subjetiva. Es interesante mencionar que dichos niveles no exceden los observados por la mañana en un control (es decir, prevalece la restricción impuesta por acción del propio reloj); estos resultados apoyan la interpretación que los cambios de excitabilidad modulan la traducción local y/o incrementan el llenado, transporte o reclutamiento de vesículas hacia las terminales. Alternativamente, el aumento de niveles podría asociarse a cambios transcripcionales, aunque dada la celeridad en la respuesta, y el contexto de la activación de la maquinaria del silenciamiento que operaría para reducir esos niveles, la consideramos menos factible. Se requerirán futuros experimentos para poder esclarecer entre estas posibilidades. La acción directa de la depolarización sobre los niveles de expresión de *pdf* serán analizados por qPCR en futuros experimentos. Una vez definido el efecto de la depolarización acotada sobre los niveles de PDF examinamos su impacto sobre la remodelación de las terminales axonales en el protocerebro dorsal. Tal como se esperaba, la depolarización forzada resulta en terminales axonales desarrolladas, lo cual confirma que la actividad se asocia a neuritogénesis.

El siguiente cuadro resume los resultados vistos en cada una de las secciones de esta tesis:

Tratamiento	Niveles de PDF	Plasticidad estructural (cantidad de cruzamientos)
<i>per^{RNAi}</i>	Disminuye la amplitud. Niveles semejantes al día, todo el día. Efecto significativo de noche.	Poca complejidad, semejante a la noche, todo del día. Efecto significativo de día.
<i>tim^{RNAi}</i>	Disminuye la amplitud. Niveles semejantes al día, todo el día. Efecto significativo de noche.	Poca complejidad, semejante a la noche, todo del día. Efecto significativo de día.
<i>cyc^{DN}</i>	Disminuye la amplitud. Niveles semejantes a la noche, todo el día. Efecto significativo de día.	Mucha complejidad, aún más que en una mañana control, todo del día. Efecto significativo de noche.
Disrupción del reloj en las glia (<i>cyc^{DN}</i>)	no afecta	Poca complejidad, semejante a la noche, todo del día. Efecto significativo de día.
Silenciamiento crónico de <i>pdf</i> (RNAi en las sLNvs)	Niveles más bajos que la noche, todo el día. Efecto significativo en todo momento.	Mucha complejidad, semejante a la mañana, todo del día. Efecto significativo de noche.
Silenciamiento crónico de <i>pdf</i> (RNAi en las ILNvs)	No afecta, aunque pareciera disminuir la amplitud de la oscilación.	Mucha complejidad, semejante a la mañana, todo del día. Efecto significativo de noche.
Silenciamiento crónico de <i>pdf</i> (RNAi en las sLNvs)	Disminuye la amplitud. Niveles intermedios de mañana y niveles bajos de noche.	Mucha complejidad, semejante a la mañana, todo del día. Efecto significativo de noche.
Silenciamiento agudo de <i>pdf</i> (RNAi en las LNvs)	Disminuye la amplitud. Niveles más bajos por la mañana.	Mucha complejidad, semejante a la mañana, todo del día. Efecto significativo de noche.
Alteración de la actividad eléctrica (TrpA1 en las LNvs)	Niveles altos, semejantes a la mañana, todo el día. Efecto significativo de noche.	Mucha complejidad, semejante a la mañana, todo del día. Efecto significativo de noche.
Alteración de la actividad eléctrica en contexto de silenciamiento de <i>pdf</i> (TrpA1+ <i>pdf^{RNAi}</i> en las LNvs)	Niveles altos, semejantes a la mañana, todo el día. Efecto significativo de noche.	Mucha complejidad, semejante a la mañana, todo del día. Efecto significativo de noche.

Conclusiones

A lo largo de la presente tesis doctoral se ha puesto en evidencia la complejidad de la regulación de dos conocidos *outputs* del reloj circadiano, la oscilación diaria de los niveles de PDF y la plasticidad estructural circadiana. Se ha aportado evidencias que el fenómeno de plasticidad estructural circadiana depende de la acción directa del reloj de las neuronas sLNvs así como de otros relojes albergados en la glia; en este sentido, cabe destacar que un tipo de glia candidato a ejercer dicha regulación es la *ensheathing* glia, la cual recubre los terminales axonales de las LNvs de manera específica (datos no mostrados). Asimismo, hemos demostrado la contribución de las ILNvs en la

regulación de ambos outputs del reloj, y, lo que es más importante, que la activación de la vía de señalización de PDFR parece provocar cambios locales en la excitabilidad los cuales a su vez generan cambios sostenidos en la remodelación de la estructura fina de las terminales axonales. Todos estos mecanismos se ponen en juego para generar un equilibrio y correcto funcionamiento de la red, para transmitir información temporal al resto del organismo. La acción conjunta y coordinada de todos estos factores es fundamental para el control circadiano de la fisiología de *Drosophila melanogaster*. Muchos elementos regulables que cooperan entre sí es lo que determina la gran plasticidad que es necesaria para que los seres vivos puedan adaptarse al medio cambiante en el que se encuentran.

Anexo 1

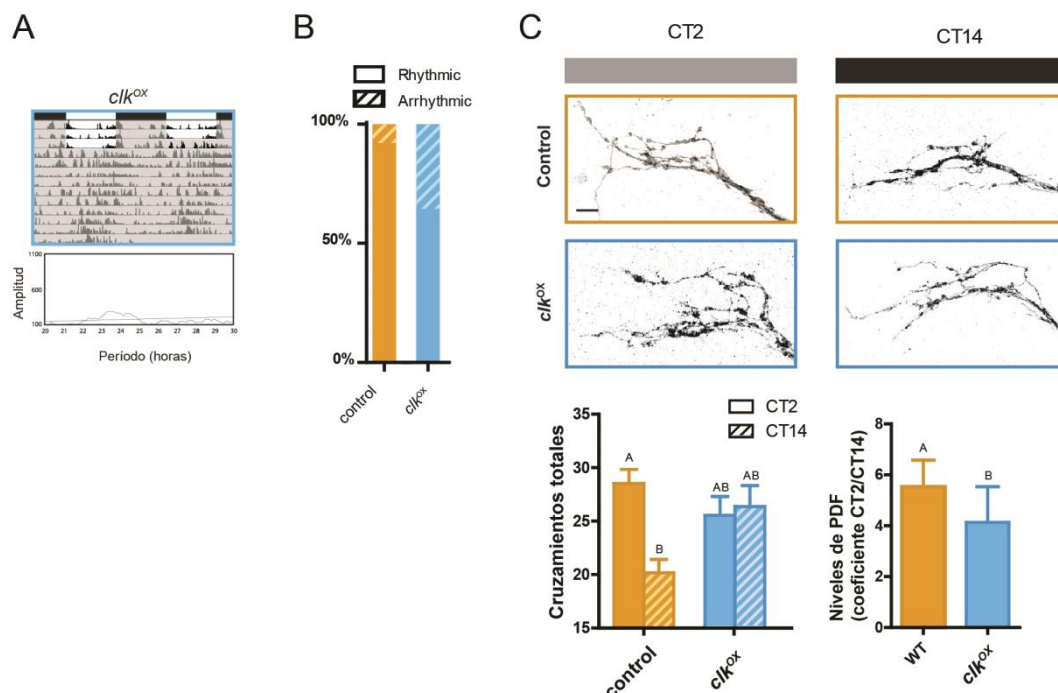


Figura 35: Sobreexpresión de dCLK en las sLNvs. **A.** Actograma representativo y su respectivo periodograma para *pdf-Gal4>UAS-clk* (*clk^{OX}*). La actividad locomotora para moscas individuales fue registrada por 4 días en ciclos de 12:12 horas de LD y luego transferidas a DD (área gris) por 9 días adicionales. En los actogramas, las barras blancas representan el día, y las negras, la noche. Para cada actograma correspondiente a un individuo, se muestran sus respectivos periodogramas del *free running* (DD) en la parte inferior. **B.** Porcentaje de ritmicidad. Los datos representan tres experimentos independientes, que incluyeron más de 44 individuos analizados en cada caso. **C.** Arriba: Imágenes representativas de microscopía confocal de la señal GFP de membrana en las terminales del protocerebro dorsal, tanto en el día subjetivo (CT2, barra gris) como en la noche subjetiva (CT14, barra negra), durante el tercer día en condiciones constantes (DD3). Abajo, izquierda: Cuantificación de los cruzamientos totales. Los animales control muestran la remodelación circadiana de sus terminales, mientras que en los animales con el reloj afectado no hay cambios a lo largo del día subjetivo. Los datos representan tres experimentos independientes (N=3) y un mínimo de 27 cerebros analizados por CT/genotipo (n=8-10). Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas con un $p < 0.05$ (ANOVA de dos vías, seguido de un *Tukey post-hoc test*). Derecha: Cuantificación de la inmunoreactividad de PDF en el protocerebro dorsal a CT2 y CT14 en DD3. Para una comparación más directa, se muestran los niveles como un coeficiente entre CT2 y CT14. En los animales control (naranja), se evidencia cambios en la inmunoreactividad de PDF entre el día y noche subjetivos, mientras que la sobreexpresión de *clk* (celeste) las diferencias son menores. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas con un $p < 0.05$ (ANOVA de una vía *Kruskal-Wallis*, seguido de un *Conover post-hoc test*, $n=8-10$, $N=3$).

Anexo 2

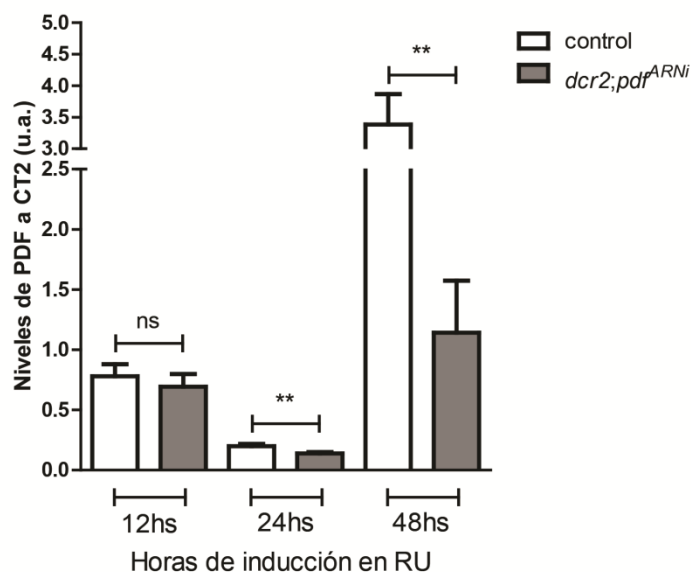


Figura 36: Eficiencia de silenciamiento de *pdf* con el sistema inducible *GeneSwitch* a diferentes tiempos de inducción. Animales que expresan el *pdf^{ARNi}* bajo el control de CD8:GFP;*pdf*-GS, fueron colocados en comida con RU por 12hs, 24hs y 48hs para permitir la visualización del fluoróforo de membrana CD8:GFP y la acción del ARNi de *pdf*. A continuación fueron disectados a CT2. Cuantificación de los niveles de PDF en el protocerebro dorsal. Se muestran los niveles para el control (blanco) y para el *pdf^{ARNi}* (gris). Los asteriscos (**) indican diferencias estadísticamente significativas con un $p < 0.01$ (ANOVA de una vía, seguido de un *Fisher post-hoc test*). Se realizó un experimento, con un mínimo de 7 cerebros analizados por condición (N=1, n=7-10).

Anexo 3

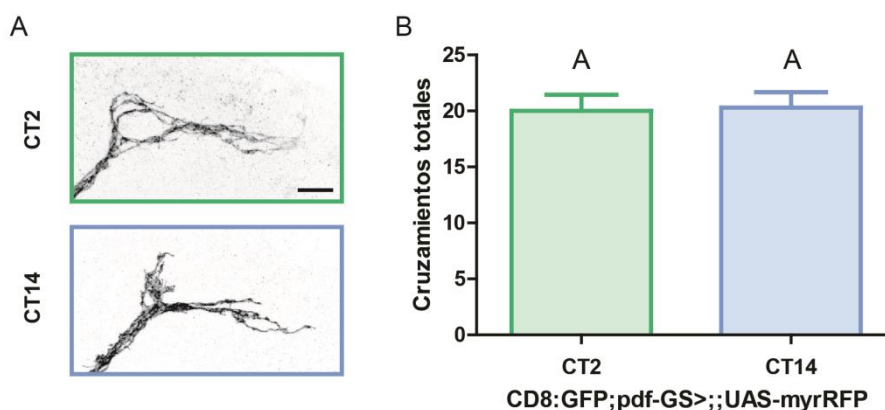


Figura 37: Expresar dos fluoróforos de membrana en las terminales dorsales genera una pérdida de la plasticidad estructural. Animales en los que se expresa el fluoróforo *myrRFP* bajo el control de la línea inductora CD8:GFP;*pdf*-GS. Los animales fueron disectados 6 días después de haber sido inducidos con RU, para activar *GeneSwitch*, a CT2 y CT14, coincidentemente con el sexto día de condiciones constantes (DD6). **A.** Imágenes representativas de microscopía confocal, del CD8:GFP en las terminales del protocerebro dorsal a CT2 y CT14. **B.** Cuantificación de los cruzamientos totales en los dos puntos horarios. No se observa el fenómeno de remodelación estructural. Los datos representan dos experimentos independientes (N=2) y un mínimo de 16 cerebros analizados por CT/genotipo (n=8-10). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas con un $p < 0.05$ (ANOVA de dos vías, seguido de un *Tukey post-hoc test*).

Bibliografía

- Allada, R., White, N.E., So, W.V., Hall, J.C., and Rosbash, M. (1998). A mutant *Drosophila* homolog of mammalian Clock disrupts circadian rhythms and transcription of period and timeless. *Cell* 93, 791-804.
- Aschoff, J., Hoffmann, K., Pohl, H., and Wever, R. (1975). Re-entrainment of circadian rhythms after phase-shifts of the Zeitgeber. *Chronobiologia* 2, 23-78.
- Ashmore, L.J., and Sehgal, A. (2003). A fly's eye view of circadian entrainment. *Journal of biological rhythms* 18, 206-216.
- Awasaki, T., Huang, Y., O'Connor, M.B., and Lee, T. (2011). Glia instruct developmental neuronal remodeling through TGF-beta signaling. *Nature neuroscience* 14, 821-823.
- Bahn, J.H., Lee, G., and Park, J.H. (2009). Comparative analysis of Pdf-mediated circadian behaviors between *Drosophila melanogaster* and *D. virilis*. *Genetics* 181, 965-975.
- Bainton, R.J., Tsai, L.T., Schwabe, T., DeSalvo, M., Gaul, U., and Heberlein, U. (2005). moody encodes two GPCRs that regulate cocaine behaviors and blood-brain barrier permeability in *Drosophila*. *Cell* 123, 145-156.
- Beaver, L.M., Gvakharia, B.O., Vollintine, T.S., Hege, D.M., Stanewsky, R., and Giebultowicz, J.M. (2002). Loss of circadian clock function decreases reproductive fitness in males of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 2134-2139.
- Becquet, D., Girardet, C., Guillaumond, F., Francois-Bellan, A.M., and Bosler, O. (2008). Ultrastructural plasticity in the rat suprachiasmatic nucleus. Possible involvement in clock entrainment. *Glia* 56, 294-305.
- Borycz, J., Borycz, J.A., Loubani, M., and Meinertzhagen, I.A. (2002). tan and ebony genes regulate a novel pathway for transmitter metabolism at fly photoreceptor terminals. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22, 10549-10557.
- Bosler, O., Girardet, C., Franc, J.L., Becquet, D., and Francois-Bellan, A.M. (2015). Structural plasticity of the circadian timing system. An overview from flies to mammals. *Frontiers in neuroendocrinology* 38, 50-64.
- Brand, A.H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.
- Brown, G.C., and Neher, J.J. (2014). Microglial phagocytosis of live neurons. *Nature reviews Neuroscience* 15, 209-216.
- Burkeen, J.F., Womac, A.D., Earnest, D.J., and Zoran, M.J. (2011). Mitochondrial calcium signaling mediates rhythmic extracellular ATP accumulation in suprachiasmatic nucleus astrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31, 8432-8440.
- Butz, M., Worgotter, F., and van Ooyen, A. (2009). Activity-dependent structural plasticity. *Brain research reviews* 60, 287-305.
- Cao, G., and Nitabach, M.N. (2008). Circadian control of membrane excitability in *Drosophila melanogaster* lateral ventral clock neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28, 6493-6501.
- Cao, G., Platasa, J., Pieribone, V.A., Raccuglia, D., Kunst, M., and Nitabach, M.N. (2013). Genetically targeted optical electrophysiology in intact neural circuits. *Cell* 154, 904-913.

- Clarke, L.E., and Barres, B.A. (2013). Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. *Nature reviews Neuroscience* 14, 311-321.
- Cyran, S.A., Buchsbaum, A.M., Reddy, K.L., Lin, M.C., Glossop, N.R., Hardin, P.E., Young, M.W., Storti, R.V., and Blau, J. (2003). *vrille*, *Pdp1*, and *dClock* form a second feedback loop in the *Drosophila* circadian clock. *Cell* 112, 329-341.
- Chaturvedi, R., Reddig, K., and Li, H.S. (2014). Long-distance mechanism of neurotransmitter recycling mediated by glial network facilitates visual function in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 2812-2817.
- Chen, W.F., Maguire, S., Sowcik, M., Luo, W., Koh, K., and Sehgal, A. (2015). A neuron-glia interaction involving GABA transaminase contributes to sleep loss in sleepless mutants. *Molecular psychiatry* 20, 240-251.
- Damulewicz, M., Rosato, E., and Pyza, E. (2013). Circadian regulation of the Na⁺/K⁺-ATPase alpha subunit in the visual system is mediated by the pacemaker and by retina photoreceptors in *Drosophila melanogaster*. *PloS one* 8, e73690.
- DeCoursey, P.J., Walker, J.K., and Smith, S.A. (2000). A circadian pacemaker in free-living chipmunks: essential for survival? *Journal of comparative physiology A, Sensory, neural, and behavioral physiology* 186, 169-180.
- Depetris-Chauvin, A., Berni, J., Aranovich, E.J., Muraro, N.I., Beckwith, E.J., and Ceriani, M.F. (2011). Adult-specific electrical silencing of pacemaker neurons uncouples molecular clock from circadian outputs. *Current biology : CB* 21, 1783-1793.
- Depetris-Chauvin, A., Fernandez-Gamba, A., Gorostiza, E.A., Herrero, A., Castano, E.M., and Ceriani, M.F. (2014). *Mmp1* processing of the PDF neuropeptide regulates circadian structural plasticity of pacemaker neurons. *PLoS genetics* 10, e1004700.
- Dubowy, C., and Sehgal, A. (2017). Circadian Rhythms and Sleep in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 205, 1373-1397.
- Duvall, L.B., and Taghert, P.H. (2012). The circadian neuropeptide PDF signals preferentially through a specific adenylate cyclase isoform AC3 in M pacemakers of *Drosophila*. *PLoS biology* 10, e1001337.
- Emery, P., So, W.V., Kaneko, M., Hall, J.C., and Rosbash, M. (1998). CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell* 95, 669-679.
- Fernandez, M.P., Berni, J., and Ceriani, M.F. (2008). Circadian remodeling of neuronal circuits involved in rhythmic behavior. *PLoS biology* 6, e69.
- Frank, M.G., and Cantera, R. (2014). Sleep, clocks, and synaptic plasticity. *Trends in neurosciences* 37, 491-501.
- Frisch, B., Hardin, P.E., Hamblen-Coyle, M.J., Rosbash, M., and Hall, J.C. (1994). A promoterless period gene mediates behavioral rhythmicity and cyclical per expression in a restricted subset of the *Drosophila* nervous system. *Neuron* 12, 555-570.
- Fuentes-Medel, Y., Ashley, J., Barria, R., Maloney, R., Freeman, M., and Budnik, V. (2012). Integration of a retrograde signal during synapse formation by glia-secreted TGF-beta ligand. *Current biology : CB* 22, 1831-1838.
- Glaser, F.T., and Stanewsky, R. (2007). Synchronization of the *Drosophila* circadian clock by temperature cycles. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 72, 233-242.

- Glossop, N.R., Houl, J.H., Zheng, H., Ng, F.S., Dudek, S.M., and Hardin, P.E. (2003). VRILLE feeds back to control circadian transcription of Clock in the *Drosophila* circadian oscillator. *Neuron* 37, 249-261.
- Glossop, N.R., Lyons, L.C., and Hardin, P.E. (1999). Interlocked feedback loops within the *Drosophila* circadian oscillator. *Science* 286, 766-768.
- Gorostiza, E.A., Depetris-Chauvin, A., Frenkel, L., Pirez, N., and Ceriani, M.F. (2014). Circadian pacemaker neurons change synaptic contacts across the day. *Current biology : CB* 24, 2161-2167.
- Gorska-Andrzejak, J. (2013). Glia-related circadian plasticity in the visual system of Diptera. *Frontiers in physiology* 4, 36.
- Gorska-Andrzejak, J., Makuch, R., Stefan, J., Gorlich, A., Semik, D., and Pyza, E. (2013). Circadian expression of the presynaptic active zone protein Bruchpilot in the lamina of *Drosophila melanogaster*. *Developmental neurobiology* 73, 14-26.
- Grima, B., Chelot, E., Xia, R., and Rouyer, F. (2004). Morning and evening peaks of activity rely on different clock neurons of the *Drosophila* brain. *Nature* 431, 869-873.
- Hamada, F.N., Rosenzweig, M., Kang, K., Pulver, S.R., Ghezzi, A., Jegla, T.J., and Garrity, P.A. (2008). An internal thermal sensor controlling temperature preference in *Drosophila*. *Nature* 454, 217-220.
- Harrisingh, M.C., Wu, Y., Lnenicka, G.A., and Nitabach, M.N. (2007). Intracellular Ca²⁺ regulates free-running circadian clock oscillation in vivo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27, 12489-12499.
- Helfrich-Forster, C. (1995). The period clock gene is expressed in central nervous system neurons which also produce a neuropeptide that reveals the projections of circadian pacemaker cells within the brain of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 612-616.
- Helfrich-Forster, C. (1997). Development of pigment-dispersing hormone-immunoreactive neurons in the nervous system of *Drosophila melanogaster*. *The Journal of comparative neurology* 380, 335-354.
- Helfrich-Forster, C. (1998). Robust circadian rhythmicity of *Drosophila melanogaster* requires the presence of lateral neurons: a brain-behavioral study of disconnected mutants. *Journal of comparative physiology A, Sensory, neural, and behavioral physiology* 182, 435-453.
- Helfrich-Forster, C., Shafer, O.T., Wulbeck, C., Grieshaber, E., Rieger, D., and Taghert, P. (2007). Development and morphology of the clock-gene-expressing lateral neurons of *Drosophila melanogaster*. *The Journal of comparative neurology* 500, 47-70.
- Herrero, A., Duhart, J.M., and Ceriani, M.F. (2017). Neuronal and Glial Clocks Underlying Structural Remodeling of Pacemaker Neurons in *Drosophila*. *Frontiers in physiology* 8, 918.
- Hyun, S., Lee, Y., Hong, S.T., Bang, S., Paik, D., Kang, J., Shin, J., Lee, J., Jeon, K., Hwang, S., *et al.* (2005). *Drosophila* GPCR Han is a receptor for the circadian clock neuropeptide PDF. *Neuron* 48, 267-278.
- Im, S.H., Li, W., and Taghert, P.H. (2011). PDFR and CRY signaling converge in a subset of clock neurons to modulate the amplitude and phase of circadian behavior in *Drosophila*. *PloS one* 6, e18974.

- Im, S.H., and Taghert, P.H. (2010). PDF receptor expression reveals direct interactions between circadian oscillators in *Drosophila*. *The Journal of comparative neurology* 518, 1925-1945.
- Jackson, F.R., Ng, F.S., Sengupta, S., You, S., and Huang, Y. (2015). Glial cell regulation of rhythmic behavior. *Methods in enzymology* 552, 45-73.
- Jud, C., Schmutz, I., Hampp, G., Oster, H., and Albrecht, U. (2005). A guideline for analyzing circadian wheel-running behavior in rodents under different lighting conditions. *Biological procedures online* 7, 101-116.
- Lamba, P., Bilodeau-Wentworth, D., Emery, P., and Zhang, Y. (2014). Morning and evening oscillators cooperate to reset circadian behavior in response to light input. *Cell reports* 7, 601-608.
- Lear, B.C., Merrill, C.E., Lin, J.M., Schroeder, A., Zhang, L., and Allada, R. (2005). A G protein-coupled receptor, groom-of-PDF, is required for PDF neuron action in circadian behavior. *Neuron* 48, 221-227.
- Lear, B.C., Zhang, L., and Allada, R. (2009). The neuropeptide PDF acts directly on evening pacemaker neurons to regulate multiple features of circadian behavior. *PLoS biology* 7, e1000154.
- Lerner, I., Bartok, O., Wolfson, V., Menet, J.S., Weissbein, U., Afik, S., Haimovich, D., Gafni, C., Friedman, N., Rosbash, M., *et al.* (2015). Clk post-transcriptional control denoises circadian transcription both temporally and spatially. *Nature communications* 6, 7056.
- Levine, J.D., Funes, P., Dowse, H.B., and Hall, J.C. (2002). Resetting the circadian clock by social experience in *Drosophila melanogaster*. *Science* 298, 2010-2012.
- Lin, Y., Stormo, G.D., and Taghert, P.H. (2004). The neuropeptide pigment-dispersing factor coordinates pacemaker interactions in the *Drosophila* circadian system. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24, 7951-7957.
- Liu, S., Lamaze, A., Liu, Q., Tabuchi, M., Yang, Y., Fowler, M., Bharadwaj, R., Zhang, J., Bedont, J., Blackshaw, S., *et al.* (2014). WIDE AWAKE mediates the circadian timing of sleep onset. *Neuron* 82, 151-166.
- Marpegan, L., Swannstrom, A.E., Chung, K., Simon, T., Haydon, P.G., Khan, S.K., Liu, A.C., Herzog, E.D., and Beaule, C. (2011). Circadian regulation of ATP release in astrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31, 8342-8350.
- McGuire, S.E., Mao, Z., and Davis, R.L. (2004). Spatiotemporal gene expression targeting with the TARGET and gene-switch systems in *Drosophila*. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2004, pl6.
- Mehnert, K.I., Beramendi, A., Elghazali, F., Negro, P., Kyriacou, C.P., and Cantera, R. (2007). Circadian changes in *Drosophila* motor terminals. *Developmental neurobiology* 67, 415-421.
- Mehnert, K.I., and Cantera, R. (2008). A peripheral pacemaker drives the circadian rhythm of synaptic boutons in *Drosophila* independently of synaptic activity. *Cell and tissue research* 334, 103-109.
- Mehnert, K.I., and Cantera, R. (2011). Circadian rhythms in the morphology of neurons in *Drosophila*. *Cell and tissue research* 344, 381-389.
- Meijer, J.H., and Rietveld, W.J. (1989). Neurophysiology of the suprachiasmatic circadian pacemaker in rodents. *Physiological reviews* 69, 671-707.
- Melom, J.E., and Littleton, J.T. (2013). Mutation of a NCKX eliminates glial microdomain calcium oscillations and enhances seizure susceptibility. *The*

- Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 33, 1169-1178.
- Mertens, I., Vandingenen, A., Johnson, E.C., Shafer, O.T., Li, W., Trigg, J.S., De Loof, A., Schoofs, L., and Taghert, P.H. (2005). PDF receptor signaling in *Drosophila* contributes to both circadian and geotactic behaviors. *Neuron* 48, 213-219.
- Mezan, S., Feuz, J.D., Deplancke, B., and Kadener, S. (2016). PDF Signaling Is an Integral Part of the *Drosophila* Circadian Molecular Oscillator. *Cell reports* 17, 708-719.
- Michael, T.P., Salome, P.A., Yu, H.J., Spencer, T.R., Sharp, E.L., McPeck, M.A., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and McClung, C.R. (2003). Enhanced fitness conferred by naturally occurring variation in the circadian clock. *Science* 302, 1049-1053.
- Miyasako, Y., Umezaki, Y., and Tomioka, K. (2007). Separate sets of cerebral clock neurons are responsible for light and temperature entrainment of *Drosophila* circadian locomotor rhythms. *Journal of biological rhythms* 22, 115-126.
- Mizrak, D., Ruben, M., Myers, G.N., Rhissorakrai, K., Gunsalus, K.C., and Blau, J. (2012). Electrical activity can impose time of day on the circadian transcriptome of pacemaker neurons. *Current biology : CB* 22, 1871-1880.
- Muraro, N., and Ceriani, M.F. (2014). Circadian rhythms. In *Behavioral Genetics of the Fly (Drosophila Melanogaster)* I.J. Dubnau, ed. (Cambridge Handbooks in Behavioral Genetics: Cambridge: Cambridge University Press), pp. 104-115.
- Muraro, N.I., and Ceriani, M.F. (2015). Acetylcholine from Visual Circuits Modulates the Activity of Arousal Neurons in *Drosophila*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35, 16315-16327.
- Muraro, N.I., Pirez, N., and Ceriani, M.F. (2013). The circadian system: plasticity at many levels. *Neuroscience* 247, 280-293.
- Ng, F.S., Sengupta, S., Huang, Y., Yu, A.M., You, S., Roberts, M.A., Iyer, L.K., Yang, Y., and Jackson, F.R. (2016). TRAP-seq Profiling and RNAi-Based Genetic Screens Identify Conserved Glial Genes Required for Adult *Drosophila* Behavior. *Frontiers in molecular neuroscience* 9, 146.
- Ng, F.S., Tangredi, M.M., and Jackson, F.R. (2011). Glial cells physiologically modulate clock neurons and circadian behavior in a calcium-dependent manner. *Current biology : CB* 21, 625-634.
- Ng, Y.K., Lu, X., and Levitan, E.S. (2002). Physical mobilization of secretory vesicles facilitates neuropeptide release by nerve growth factor-differentiated PC12 cells. *The Journal of physiology* 542, 395-402.
- Nitabach, M.N., Blau, J., and Holmes, T.C. (2002). Electrical silencing of *Drosophila* pacemaker neurons stops the free-running circadian clock. *Cell* 109, 485-495.
- Nitabach, M.N., Wu, Y., Sheeba, V., Lemon, W.C., Strumbos, J., Zelensky, P.K., White, B.H., and Holmes, T.C. (2006). Electrical hyperexcitation of lateral ventral pacemaker neurons desynchronizes downstream circadian oscillators in the fly circadian circuit and induces multiple behavioral periods. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26, 479-489.
- Osterwalder, T., Yoon, K.S., White, B.H., and Keshishian, H. (2001). A conditional tissue-specific transgene expression system using inducible GAL4.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98, 12596-12601.
- Ouyang, Y., Andersson, C.R., Kondo, T., Golden, S.S., and Johnson, C.H. (1998). Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 8660-8664.
- Park, J.H., and Hall, J.C. (1998). Isolation and chronobiological analysis of a neuropeptide pigment-dispersing factor gene in *Drosophila melanogaster*. *Journal of biological rhythms* 13, 219-228.
- Park, J.H., Helfrich-Forster, C., Lee, G., Liu, L., Rosbash, M., and Hall, J.C. (2000). Differential regulation of circadian pacemaker output by separate clock genes in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 3608-3613.
- Peng, Y., Stoleru, D., Levine, J.D., Hall, J.C., and Rosbash, M. (2003). *Drosophila* free-running rhythms require intercellular communication. *PLoS biology* 1, E13.
- Peschel, N., and Helfrich-Forster, C. (2011). Setting the clock--by nature: circadian rhythm in the fruitfly *Drosophila melanogaster*. *FEBS letters* 585, 1435-1442.
- Petsakou, A., Sapsis, T.P., and Blau, J. (2015). Circadian Rhythms in Rho1 Activity Regulate Neuronal Plasticity and Network Hierarchy. *Cell* 162, 823-835.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 29, e45.
- Picot, M., Cusumano, P., Klarsfeld, A., Ueda, R., and Rouyer, F. (2007). Light activates output from evening neurons and inhibits output from morning neurons in the *Drosophila* circadian clock. *PLoS biology* 5, e315.
- Pittendrigh, C.S. (1960). Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 25, 159-184.
- Pyza, E., and Gorska-Andrzejak, J. (2004). Involvement of glial cells in rhythmic size changes in neurons of the housefly's visual system. *Journal of neurobiology* 59, 205-215.
- Pyza, E., and Meinertzhagen, I.A. (1999). Daily rhythmic changes of cell size and shape in the first optic neuropil in *Drosophila melanogaster*. *Journal of neurobiology* 40, 77-88.
- Ralph, M.R., and Lehman, M.N. (1991). Transplantation: a new tool in the analysis of the mammalian hypothalamic circadian pacemaker. *Trends in neurosciences* 14, 362-366.
- Renn, S.C., Park, J.H., Rosbash, M., Hall, J.C., and Taghert, P.H. (1999). A pdf neuropeptide gene mutation and ablation of PDF neurons each cause severe abnormalities of behavioral circadian rhythms in *Drosophila*. *Cell* 99, 791-802.
- Reppert, S.M., and Weaver, D.R. (2001). Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annual review of physiology* 63, 647-676.
- Rieger, D., Wulbeck, C., Rouyer, F., and Helfrich-Forster, C. (2009). Period gene expression in four neurons is sufficient for rhythmic activity of *Drosophila melanogaster* under dim light conditions. *Journal of biological rhythms* 24, 271-282.
- Roberts, L., Leise, T.L., Noguchi, T., Galschiodt, A.M., Houl, J.H., Welsh, D.K., and Holmes, T.C. (2015). Light evokes rapid circadian network oscillator

- desynchrony followed by gradual phase retuning of synchrony. *Current biology : CB* 25, 858-867.
- Ruiz, S., Ferreiro, M.J., Casanova, G., Olivera, A., and Cantera, R. (2010). Synaptic vesicles in motor synapses change size and distribution during the day. *Synapse* 64, 14-19.
- Ruiz, S., Ferreiro, M.J., Menhert, K.I., Casanova, G., Olivera, A., and Cantera, R. (2013). Rhythmic changes in synapse numbers in *Drosophila melanogaster* motor terminals. *PloS one* 8, e67161.
- Rusan, Z.M., Kingsford, O.A., and Tanouye, M.A. (2014). Modeling glial contributions to seizures and epileptogenesis: cation-chloride cotransporters in *Drosophila melanogaster*. *PloS one* 9, e101117.
- Rutila, J.E., Suri, V., Le, M., So, W.V., Rosbash, M., and Hall, J.C. (1998). CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila* period and timeless. *Cell* 93, 805-814.
- Sabado, V., Vienne, L., Nunes, J.M., Rosbash, M., and Nagoshi, E. (2017). Fluorescence circadian imaging reveals a PDF-dependent transcriptional regulation of the *Drosophila* molecular clock. *Scientific reports* 7, 41560.
- Schlichting, M., Menegazzi, P., Lelito, K.R., Yao, Z., Buhl, E., Dalla Benetta, E., Bahle, A., Denike, J., Hodge, J.J., Helfrich-Forster, C., *et al.* (2016). A Neural Network Underlying Circadian Entrainment and Photoperiodic Adjustment of Sleep and Activity in *Drosophila*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 36, 9084-9096.
- Seluzicki, A., Flourakis, M., Kula-Eversole, E., Zhang, L., Kilman, V., and Allada, R. (2014). Dual PDF signaling pathways reset clocks via TIMELESS and acutely excite target neurons to control circadian behavior. *PLoS biology* 12, e1001810.
- Seugnet, L., Suzuki, Y., Merlin, G., Gottschalk, L., Duntley, S.P., and Shaw, P.J. (2011). Notch signaling modulates sleep homeostasis and learning after sleep deprivation in *Drosophila*. *Current biology : CB* 21, 835-840.
- Shafer, O.T., Kim, D.J., Dunbar-Yaffe, R., Nikolaev, V.O., Lohse, M.J., and Taghert, P.H. (2008). Widespread receptivity to neuropeptide PDF throughout the neuronal circadian clock network of *Drosophila* revealed by real-time cyclic AMP imaging. *Neuron* 58, 223-237.
- Shafer, O.T., Rosbash, M., and Truman, J.W. (2002). Sequential nuclear accumulation of the clock proteins period and timeless in the pacemaker neurons of *Drosophila melanogaster*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22, 5946-5954.
- Shakiryanova, D., Klose, M.K., Zhou, Y., Gu, T., Deitcher, D.L., Atwood, H.L., Hewes, R.S., and Levitan, E.S. (2007). Presynaptic ryanodine receptor-activated calmodulin kinase II increases vesicle mobility and potentiates neuropeptide release. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27, 7799-7806.
- Shakiryanova, D., Tully, A., Hewes, R.S., Deitcher, D.L., and Levitan, E.S. (2005). Activity-dependent liberation of synaptic neuropeptide vesicles. *Nature neuroscience* 8, 173-178.
- Sharma, V.K. (2003). Adaptive significance of circadian clocks. *Chronobiology international* 20, 901-919.
- Sholl, D.A. (1953). Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *Journal of anatomy* 87, 387-406.

- Sivachenko, A., Li, Y., Abruzzi, K.C., and Rosbash, M. (2013). The transcription factor Mef2 links the *Drosophila* core clock to Fas2, neuronal morphology, and circadian behavior. *Neuron* 79, 281-292.
- Sokolove, P.G., and Bushell, W.N. (1978). The chi square periodogram: its utility for analysis of circadian rhythms. *Journal of theoretical biology* 72, 131-160.
- Stanewsky, R., Kaneko, M., Emery, P., Beretta, B., Wager-Smith, K., Kay, S.A., Rosbash, M., and Hall, J.C. (1998). The cryb mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell* 95, 681-692.
- Stoleru, D., Nawathean, P., Fernandez, M.P., Menet, J.S., Ceriani, M.F., and Rosbash, M. (2007). The *Drosophila* circadian network is a seasonal timer. *Cell* 129, 207-219.
- Stoleru, D., Peng, Y., Agosto, J., and Rosbash, M. (2004). Coupled oscillators control morning and evening locomotor behaviour of *Drosophila*. *Nature* 431, 862-868.
- Stoleru, D., Peng, Y., Nawathean, P., and Rosbash, M. (2005). A resetting signal between *Drosophila* pacemakers synchronizes morning and evening activity. *Nature* 438, 238-242.
- Stork, T., Bernardos, R., and Freeman, M.R. (2012). Analysis of glial cell development and function in *Drosophila*. *Cold Spring Harbor protocols* 2012, 1-17.
- Stork, T., Sheehan, A., Tasdemir-Yilmaz, O.E., and Freeman, M.R. (2014). Neuron-glia interactions through the Heartless FGF receptor signaling pathway mediate morphogenesis of *Drosophila* astrocytes. *Neuron* 83, 388-403.
- Stuart, A.E., Borycz, J., and Meinertzhagen, I.A. (2007). The dynamics of signaling at the histaminergic photoreceptor synapse of arthropods. *Progress in neurobiology* 82, 202-227.
- Suh, J., and Jackson, F.R. (2007). *Drosophila* ebony activity is required in glia for the circadian regulation of locomotor activity. *Neuron* 55, 435-447.
- Taghert, P.H., Hewes, R.S., Park, J.H., O'Brien, M.A., Han, M., and Peck, M.E. (2001). Multiple amidated neuropeptides are required for normal circadian locomotor rhythms in *Drosophila*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21, 6673-6686.
- Tanenhaus, A.K., Zhang, J., and Yin, J.C. (2012). In vivo circadian oscillation of dCREB2 and NF-kappaB activity in the *Drosophila* nervous system. *PloS one* 7, e45130.
- Tanoue, S., Krishnan, P., Krishnan, B., Dryer, S.E., and Hardin, P.E. (2004). Circadian clocks in antennal neurons are necessary and sufficient for olfaction rhythms in *Drosophila*. *Current biology : CB* 14, 638-649.
- Weber, P., Kula-Eversole, E., and Pyza, E. (2009). Circadian control of dendrite morphology in the visual system of *Drosophila melanogaster*. *PloS one* 4, e4290.
- Welsh, D.K., Takahashi, J.S., and Kay, S.A. (2010). Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. *Annual review of physiology* 72, 551-577.
- Wheeler, D.A., Hamblen-Coyle, M.J., Dushay, M.S., and Hall, J.C. (1993). Behavior in light-dark cycles of *Drosophila* mutants that are arrhythmic, blind, or both. *Journal of biological rhythms* 8, 67-94.

- Yoshii, T., Ahmad, M., and Helfrich-Forster, C. (2009a). Cryptochrome mediates light-dependent magnetosensitivity of *Drosophila*'s circadian clock. *PLoS biology* 7, e1000086.
- Yoshii, T., Vanin, S., Costa, R., and Helfrich-Forster, C. (2009b). Synergic entrainment of *Drosophila*'s circadian clock by light and temperature. *Journal of biological rhythms* 24, 452-464.
- Yoshii, T., Wulbeck, C., Sehadova, H., Veleri, S., Bichler, D., Stanewsky, R., and Helfrich-Forster, C. (2009c). The neuropeptide pigment-dispersing factor adjusts period and phase of *Drosophila*'s clock. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29, 2597-2610.
- Zerr, D.M., Hall, J.C., Rosbash, M., and Siwicki, K.K. (1990). Circadian fluctuations of period protein immunoreactivity in the CNS and the visual system of *Drosophila*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 10, 2749-2762.
- Zhang, Y., Liu, Y., Bilodeau-Wentworth, D., Hardin, P.E., and Emery, P. (2010). Light and temperature control the contribution of specific DN1 neurons to *Drosophila* circadian behavior. *Current biology : CB* 20, 600-605.